



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

“Reguladores globales en *Escherichia coli*: su efecto en el metabolismo central y en la síntesis de compuestos de interés biotecnológico”

Lic. Diego Ezequiel Egoburo

Directora de tesis: Dra. María Julia Pettinari

Consejero de estudios: Dra. Mariana Piuri

Lugar de trabajo: Laboratorio Genética y Fisiología de Bacterias de interés biotecnológico, Dpto. de Qca. Biológica, FCEyN, UBA.

Buenos Aires, 2019

Agradecimientos

Y llega el momento en que debo decir: ¡gracias!

Pufffff!!! Si, esa expresión es lo que define mejor esta sección, ya que agradecer no es sólo una expresión, sino manifestar con palabras lo que uno lleva dentro del corazón. Algo que es menester dejar plasmado aquí es que de todas las cosas que logré hacer con mi vida, ninguna de ellas las alcancé solo. Siempre me salieron al encuentro personas que me ayudaron más de lo que debían, algo que se puso de manifiesto particularmente en este doctorado. Entonces no resulta nada fácil que los agradecimientos no se conviertan en el equivalente en hojas a otra tesis y/o en una maraña inentendible de palabras concatenadas.

El primer lugar resulta fácil y le pertenece a mi esposa. Amor, sos la bendición de mi vida, todos los que nos conocen advierten siempre que soy alguien con mucha suerte por tenerte, de hecho, la mayoría te compadecen. Debo aclararles a todos que tienen razón en lo de compadecerte, sin embargo, no tengo suerte, sino que soy bendecido por poder compartir mi vida con vos, más allá de que sería básicamente Homero, peleado con Marge, en la casita del árbol con pantalones harapientos. Mucho tiempo soñé en que podríamos compartir la vida, pero realmente muchas veces estuve seguro que no iba a pasar. Hoy sos ese sueño cumplido y algo que siempre voy a agradecerle a Dios. Gracias por un plato de comida caliente, un abrazo, los fines y feriados en el labo cuando me acompañabas para no dejarme solo, incluso ayudarme con los experimentos, sos increíble. No sé por dónde empezar ni terminar, pero lo voy a resumir así: gracias por no dejarme abandonar en los momentos en que mis brazos no quieren levantarse.

Pegadito van los familiares: menos mal que tengo pocos jaja. A mi madre, la mujer más increíble que jamás voy a conocer. Una frase que más o menos resume lo que quiero decirte es: todo lo bueno que hay en mi fue sembrado por vos; y todo lo malo, de vos no lo aprendí. Tu amor, tu fuerza y tu dedicación son el legado más grande que nadie me dejará nunca. Como si fuera poco, me hiciste varios experimentos de esta tesis, mucho más fáciles.

A mi hermana Lorena, quien muchas veces sabe que me pasa y me conoce, aun a la distancia. Alguien con quien siempre pude hablar todo y que siempre me respaldó, aunque no estuviera de acuerdo conmigo. Tus oraciones fueron un pilar en noches demasiado oscuras.

A Gastón y Mauro, dos personas de las que estoy increíblemente orgulloso, mis sobrinos. Todavía recuerdo cuando me llamaban muy temprano en la mañana sólo para decirme que me querían

mucho y que yo era parte de sus alegrías, de sus triunfos. De hecho, eso me lo siguen diciendo y tengo que decirles que muchas veces fueron el motor que me permitió seguir.

Y Dami, el primero en sumarse a la familia y último, por ahora jaja. Dami sos uno de los pocos amigos que tengo, de hecho, sos el hermano que la vida no me dio, pero Dios me regaló. Te agradezco por estar siempre y por cuidar de toda mi familia. Sos una mano siempre dispuesta a ayudarme y no te das una idea de cuanto lo valoro.

¡¡¡Mi Chafito!!!! Mi perrito más lindo del universo, simplemente me haces feliz, ¡estúpido y sensual perro! Pensar que alguna vez me negué a que vengas a casa. Que sería de mí sin esa alegría incontenible con la que siempre me recibís, aunque probablemente estaría menos roto de lo que estoy. Mi mejor amigo.

A Seba, mi amigo de la vida. Una persona que me sorprende por ser tan buena, coherente y desinteresada. No puedo contar ya las veces que estuviste ahí para darme un mano sin pedir nada a cambio. Gracias por ser mi amigo, una frase para nada trivial. Una frase para vos: ¡eres feo y nadie te quiere, si viene un extraño y te dice que te subas al auto, te subes! jajaja. En esta categoría tengo sumar al pardo cordobés, a quien no conozco hace mucho, pero parece un amigo de toda la vida. Emi gracias por los intercambios de fe, las charlas de la vida y la oreja para los problemas. Otro amigo sincero, que siempre está preguntando como ando. Pocas veces se encuentran muchas personas así, con lo cual me considero bendecido. Los quiero amigos.

Julia, tengo tanto que agradecerte. Lo primero es la oportunidad de hacer lo que amo, cosa que infinidad de veces pensé que no iba a pasar. Gracias también por la libertad, por el ambiente genial de trabajo que generas y por soportar mis horarios extraños y mis ideas también raras. Gracias por tus consejos, advertencias y enseñarme a transmitir los resultados de este trabajo de forma brillante. Tu buena onda es algo no tan común de encontrar en un trabajo. Gracias por sacarme una de las dudas existenciales que siempre tuve: si tenía pasta para esto.

¡Y ahora llego el momento de QB30! Acá el orden ya carece de sentido con lo cual empiezo por la primera persona de la que tengo recuerdo el primer día de labo, alguien rubio y sin rulos jaja: Manuel, agradecerte siempre me va a parecer poco, de vos aprendí todo, desde lavar un tip hasta usar un fermentador. Esa dedicación, compromiso y rigurosidad científica me marcaron un camino claro. Probablemente nunca sea tan aplicado, pero referencia me sobró. También debo agradecerte muchas manías que facilitaron de una forma enorme mi doctorado. ROCÍO, espero que las mayúsculas ilustren un poco lo que agradezco a Dios por ser mi compañera de labo, de desafíos, de cursos, de días larguísimos, de semanas de depresión, de alegrías, de risas, de llantos. Alguien que

también me deja perplejo por su empuje, dedicación, integridad, pero, sobre todo, su amabilidad y su amor hacia la ciencia. Gracias por estar ahí de todas las formas posibles, espero haberte devuelto al menos un décimo que todo lo que hiciste por mí, mi familia y esta tesis. Por cierto, la primera impresión que tuve sobre vos, es el error más terrible que probablemente cometa: una frase para el recuerdo “Y tu Rocío eres la peor persona que conozco” viene a colación jaja. Dani, alguien con quien el labo, los días laborales, los días grises cobran otro significado. Otro ejemplo de trabajo y lo que significa ser buena persona, con quien puedo discutir de cualquier cosa y siempre tenemos un punto en común. Gracias por todas tus increíbles contribuciones a este trabajo, pero más que eso, gracias porque siempre siento que me comprendes, sobre todo cuando me quejo. Una amiga, como pocas veces se encuentran (probablemente nunca te perdona que no veas los Simpsons). Espero haberte transmitido la forma correcta de colapsar y admiro tu capacidad de asombro jaja. Y Mariela, la más ortiva del labo jaja. Mentira, una enorme profesional que admiro mucho, con una capacidad envidiable y de quien agradezco que siempre tenga tiempo para responder una pregunta, dar una opinión para mejorar y ser siempre sincera conmigo. Me diste empujones enormes y valoro muchísimo que siempre me tengas en cuenta para algún proyecto. Nunca nos peleamos seriamente y de verdad me llama la atención jaja. A Gon, gracias también por hacer de los días laborales más amenos y divertidos. Espero poder transmitirme algo de todo lo que recibí de este maravilloso laboratorio.

Esmeralda, uno de los vértices del triángulo del mal, todavía me extraña que no nos hayamos boxeado nunca en el labo jajaja. Gracias por las charlas, el aguante, las canciones y como sufrimos con ¡¡las benditas RT-PCRs!! Una gran profesional. La tucumana, esa alegría contagiosa e intensa, sobre todo intensa, es capaz de hacerte olvidar cualquier drama. Gracias por compartirla conmigo y ser una excelente compañera y persona; y gracias por ¡¡las metanólisis!! José, no estamos de acuerdo en casi nada, pero nos llevamos bien y siempre estás dispuesto a darme una mano, a responderme una duda, eso habla del buen tipo que sos. Gracias por las risas, los mates y algo que admiro de vos es el buen criterio que tenés, no sólo a la hora de hacer ciencia. Paula, otra bestia de la ciencia, gracias por tus consejos, sobre todo el: ¡no te duermas, que esto pasa rápido!, cuanta razón tenías. A Leti y Flor, gracias por ser increíbles personas y superdedicadas en su paso por el labo. Facu, si sólo fueras macrista sería muy fácil no quererte pero además son buen tipo, con lo cual haces todo muy difícil jaja. Admiro la firmeza con la que defendes tu postura y algo que quiero decirte para que atesoras: ¡Apaga el flujo! Rosario gracias por tu buena onda y compañerismo y ¡devolveme la tijera! Jaja.

Laura, te agradezco porque siempre estas dispuesta a resolverme las dudas, sobre todo en esas de noches de colapso. Gracias por estar siempre tratando de ayudar, no sólo a mí, ¡y por los muy interesantes intercambios teológicos! Nancy, gracias por ser alguien que busca soluciones hasta donde no las hay, siempre aportar y ayudarme en todo, desde reactivos hasta dinero, cuando peligró el pago de mi beca. Maria Elisa gracias por transmitir ese enorme amor por la ciencia, es algo increíble esa dedicación y por tenerme en cuenta para tu trabajo, fue un bello desafío. A Beatriz le agradezco su preocupación por mí y por este doctorado y sus sugerencias tan acertadas, una leyenda de este departamento.

¡BEDELIA! lo digo siempre, ¡¡¡gracias por existir!!! Hacen la vida tan fácil a veces. Eva, te agradezco por soportarme y por confiar en mí, tanto para pertenecer al staff como todos los días en el trabajo cotidiano. ¡Gracias por solucionarme la vida y no sólo la de becario! Sos una profesional gigante, que admiro mucho también y cuya dedicación es preocupante jaja. Pato, gracias por estar siempre sumando y nunca restando, por las charlas, mates y depresiones compartidas jaja. Na, Ari, Sole, Sonia, Ceci, Marce me encanta laburar con ustedes, gracias por esa buena onda, el toque justo de sarcasmo y hacer los días más fáciles. Mi querido Martin, el técnico de mis sueños, gracias por tu buena onda y darle particular atención a nuestros equipos, sos groso.

A Adriana Kolender, una genia desde todos los puntos de vista le agradezco todos sus aportes, es un enorme placer haber trabajado con vos. Tu ayuda con la cromatografía ha sido invaluable para mí y este trabajo. Tu buena onda, las veces que me habrás escuchado quejarme de todo. Gracias por todo lo que me enseñaste.

A los labos 40-43, chicas son geniales, Joaqui, Lili, Estefi, Euge, Flor, Mer y Marianita. Gente de 10 y súper profesionales, con las que siempre se puede contar, ya sea por reactivos, consejos y, sobre todo, colapsos. A Sandra Ruzal por su buena onda, siempre dispuesta a ayudar y colaborar en todo lo que puede. ¡Gracias por confiar en Rocío y en mí para utilizar el GC, que responsabilidad! A Mariana Piuri, en particular, gracias por ser mi consejera, sus aportes y, sobre todo, por leer mis interminables informes de doctorado, siempre entregados un rato antes del plazo límite.

A los Cortones, Fede, Albert, María y Eduardo. Siempre dispuestos a ayudar, gracias por las miles de veces que les pedí la balanza, herramientas, y destaco a María, por el fatídico día en que casi muero en el labo y ¡estuvo conmigo en todo momento! Fede, gracias por las charlas y la confianza transmitida, sos una excelente persona.

A la gente Tóxico, de la que siempre obtuve ayuda y consejos valiosos. Noemí, Julio, Marce, Orne y Julián. Gracias Julián por las miles de preguntas sobre cromatografía contestadas, los líos resueltos con los equipos y la buena onda a altísimas horas de la noche.

Al plantel no docente, Ale, Maxi, Gladys, Miriam, Francisco, Andrés, Carlitos, Susana, M. José. Gracias por el buen humor, las charlas y por hacernos la vida más fácil a toda la comunidad de QB.

A las autoridades del departamento, Marcelo Martí, gracias por tenerme en cuenta y confiar en mí.

Por su ayuda y practicidad a la hora de resolver problemas, siempre dispuesto a contemplar mis dificultades. Al IQUIBICEN, a Elba Vázquez por también tenerme en cuenta y confiar en mi criterio.

A las secretarías, Ayelén y Dana, gracias por ayudarnos a lidiar con la bendita burocracia.

Y no puedo dejar de agradecer a mi país. Una nación tan golpeada pero tan dispuesta a levantarse a la vez. Veo un claro ejemplo en la FCEN, particularmente en QB. Un lugar con tantas limitaciones y complejidades, pero con gente que hace infinidad de esfuerzos para que funcione, pone el alma y el corazón por la ciencia de este país, nunca dejando de lado el costado humano que la misma necesita. Profesionalismo, vocación y entrega, son valores en demasía en el ámbito de la facu. A la universidad pública, gratuita y de excelencia, le agradezco las puertas que me abrió, de otra manera hubiera sido simple y llanamente imposible ser un profesional y disfrutar de lo que amo.

Llegando al final, tengo que decir que me llevo tantas cosas de esta experiencia, lo más importante es siempre quise saber que se sentía ser científico. A los que conocen mi historia, saben que las probabilidades de llegar hasta acá eran escasas. Y de no ser por Dios, lo más seguro hubiera sido el fracaso. A Dios le agradezco sacarme del pozo donde había caído, por darme la fe y la esperanza de que podía lograrlo, por mirarme y abrazarme cuando nadie más lo hizo, de darme una forma radicalmente diferente de ver la vida misma. A partir de esto, el doctorado fue casi un sueño, a veces opacado por las dificultades de la vida y aquellas propias de nuestro sistema científico, pero reivindicado por tamañas personas y profesionales que encontré en el camino y que hicieron de esto, una de las mejores cosas que me han pasado, a pesar de mis quejas constitutivas. Recapitulando, la conclusión es que ha sido un privilegio, porque descubrí que se siente hacer ciencia, siento que soy un científico, aunque claro es una percepción sólo mía tal vez. Aprendí a lidiar con la frustración, a alegrarme de las pequeñas cosas y tener pensamiento crítico. Esto último, es de lo mejor que me llevo del doctorado.

Siento que estos últimos 4 años caminé a hombros de gigantes, que han marcado el camino, que han hecho ciencia y que siguen formando a los que vienen, desde la ciencia y la docencia. Agrego, además, gigantes que han hecho sacrificios igual de grandes.

Abreviaturas

ACP	Análisis de componentes principales
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ap	Ampicilina
BDO	1,4-butanodiol
ButOH	Butanol
CCR	<i>Carbon catabolite repression</i>
Cm	Cloranfenicol
CV	Coeficiente de variación
DER	Desvío estándar relativo
DHA	Dihidroxiacetona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO/DO ₆₀₀	Densidad óptica/densidad óptica medida a $\lambda = 600$ nm
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
ERO	Especies reactivas del oxígeno
EtOH	Etanol
FBP	Fructosa bifosfato
Fdh	Formiato deshidrogenasa
F1P	Fructosa 1-fosfato
GDHt	Glicerol deshidrogenasa
H ⁺	Protón
HPA	3-hidroxipropionaldehído
ICH	<i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for Human Use</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>
NAD ⁺	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido oxidada
NADH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido reducida
NADPH	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-fosfato reducida
OAA	Oxalacetato
Pck	Piruvato carboxiquinasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDO	1,3-propanodiol
PDOR	PDO óxidoreductasa
PEP	Fosfoenolpiruvato
PHB	Polihidroxibutirato
Ppc	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
PTS	<i>Phosphotransferase system</i>
PTT	Politrimetilentereftalato
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
TCA	<i>Tricarboxylic acids cycle</i>
Tet	tetraciclina
Tris	2-Amino-2-hidroximetil-aminometano
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
vol	Volumen
Y _{A/B}	Rendimiento de A respecto del parámetro B
μ (max)	Velocidad específica (máxima) de crecimiento

Índice

RESUMEN	15
ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN.REGULACIÓN GÉNICA EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	18
Regulación global en Escherichia coli	18
ArcAB: regulación de la respuesta de adaptación metabólica a la disponibilidad de oxígeno en E. coli	20
Generalidades	20
Percepción de la disponibilidad de oxígeno en Enterobacteriaceae	20
El sensor de membrana ArcB	21
ArcA, regulador de la respuesta	22
El regulador global CreCB.....	23
Mecanismo de acción	23
Regulón cre y su efecto sobre el metabolismo	24
Regulación global del flujo de carbono: Cra y Crp	25
Represión catabólica	25
Mecanismo de acción	26
Sistema PTS.....	27
Represión catabólica en E. coli	27
Regulación global independiente de AMPc: Catabolite repressor/activator Cra	29
Cra, regulador global del flujo de carbono	29
Mecanismo de acción	30
Regulón cra	32
Rob, regulación del metabolismo intermedio y de la tolerancia a compuestos tóxicos.....	33
El regulón MarA/SoxS/Rob.....	33
Funciones a asociadas a Rob	34
Sobreexpresión de Rob en E. coli.....	35
Reguladores globales como herramientas biotecnológicas	36
Manipulación de flujos de carbono y poder reductor para la síntesis de compuestos biotecnológicos	38

Identificación de los efectos derivados de la manipulación de reguladores globales	39
El uso de contextos genéticos definidos	41
RESPUESTA A ESTRÉS EN <i>E. COLI</i>.....	43
Impacto de la regulación global en la respuesta a estrés	44
Respuesta a estrés en bioprocesos	45
Solventes.....	45
Gradientes de nutrientes y oxígeno.....	46
Sobreproducción de proteínas recombinantes.....	48
Estrategias para aumentar la tolerancia a solventes y biocombustibles.....	48
Evolución adaptativa en laboratorio	48
Manipulación de transportadores de membrana: bombas de eflujo	49
Sobreexpresión de proteínas asociadas a la respuesta a estrés	49
PRODUCTOS MICROBIANOS DE INTERÉS INDUSTRIAL	52
Ácido succínico	52
Mercado	52
Importancia industrial.....	52
Producción de succinato	53
Productores naturales.....	54
Producción de succinato en organismos modificados genéticamente	55
Eliminación de vías competitivas.....	56
Mejora de las vías de síntesis de succinato	56
Mejora en los sistemas de transporte de fuentes de carbono.....	57
Optimización de cofactores	57
Estrategias alternativas	58
1,3-propanodiol	59
Importancia industrial.....	60
Usos del PDO para la producción de polímeros industriales: Politrimetilentereftalato.....	61
Biosíntesis de 1,3-propanodiol.....	61
Ingeniería genética para la producción de PDO	63
Inactivación génica	63

Sobreexpresión de genes.....	64
Manipulación de cofactores	64
Uso de mutagénesis no dirigida para mejorar la obtención de PDO	65
Estrategia de fermentación en biorreactor para incrementar la síntesis de PDO	65
Uso de sustratos múltiples	66
OBJETIVOS	67
MATERIALES Y MÉTODOS	69
Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	69
Medio LB	70
Medios complejos para la validación cromatográfica.....	70
Medio mínimo M9	70
SOB, SOC y LB-CaCl ₂	71
Antibióticos y aditivos	71
Cultivos alta y baja aireación en frasco agitado	71
Cultivos sin aireación	72
Cultivos para la evaluación de la tolerancia	72
Cultivos de cepas recombinantes para producción de biocompuestos.....	73
Cultivos para la optimización de ácido succínico	73
Cultivos para la optimización de PDO	74
Manipulaciones genéticas y técnicas de biología molecular.....	75
Extracción de Plásmidos.....	75
Digestión con enzimas de restricción.....	75
Purificación de DNA.	76
Reacciones de ligado.....	76
Electroforesis en geles de agarosa.	76
Cuantificación de DNA.	76
Preparación de células competentes.	76
Transformación de células competentes.	77
Remoción del casete de Km de las cepas Keio.....	77
Construcción de pPhaP328	78
Manipulación de proteínas	78

Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	78
Western blot	78
Métodos analíticos	79
Determinación de biomasa.....	79
Cuantificación de ácidos en sobrenadante	79
Cuantificación de PHB	80
Determinación de glucosa en sobrenadante.	80
Determinación de etanol, PDO y glicerol	80
Validación analítica de la determinación de PDO y glicerol	81
Linealidad	81
Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	81
Precisión.....	82
Exactitud	82
Estabilidad.....	82
Selectividad y robustez	82
Análisis estadístico de los resultados	83
 CAPITULO I. EFECTO DE LOS REGULADORES GLOBALES SOBRE EL METABOLISMO Y LA TOLERANCIA A ESTRÉS EN <i>E. COLI</i>	 85
Prefacio	86
Caracterización del crecimiento y el metabolismo de mutantes de reguladores globales	89
Biomasa y tasa de crecimiento en ausencia de los reguladores Rob, Cra, ArcA y CreC.....	89
Síntesis de ácidos orgánicos y etanol en baja aireación	91
Análisis de metabolitos en cepas Δrob y Δcra en cultivos no aireados.....	93
Estimación de estado redox a través del cociente [etanol]/[acetato]	94
Ensayos de tolerancia	96
Crecimiento en medio sólido M9 y LB con azul de toluidina	96
Sensibilidad de las cepas a alcoholes en diferentes condiciones de aireación	97
Tolerancia a etanol	98
Tolerancia a 1,3-propanodiol.....	98
Tolerancia a n-butanol.....	99

Estrés inducido por NaCl y tetraciclina	100
Efecto de la sobreexpresión de Rob sobre la tolerancia a alcoholes	101
Búsqueda de patrones fenotípicos por análisis de componentes principales	103
Patrones en la síntesis de metabolitos	103
Análisis por estadística multivariada de los estudios de tolerancia	105
Efecto de la aireación sobre la tolerancia de las cepas mutantes	105
Patrones en la respuesta metabólica y fisiológica de las diferentes mutantes	107
Discusión y conclusiones parciales	108
Perfiles metabólicos	108
Efectos cepa-dependientes	110
Tolerancia	110
Análisis multivariado	111
 CAPITULO II. IDENTIFICACIÓN DE CONTEXTOS GENÉTICOS ADECUADOS PARA LA SÍNTESIS DE COMPUESTOS BIOTECNOLÓGICOS	 113
Prefacio	114
Evaluación del potencial biotecnológico de las cepas mutantes de reguladores globales	115
Etanol	116
Síntesis de Etanol a partir de glucosa	117
Síntesis de Etanol a partir de glicerol	118
Uso simultáneo de glucosa y glicerol para la síntesis de etanol	119
Diferencias en el uso de sustrato	121
Síntesis de PHB	121
Síntesis de 1,3-propanodiol	123
Determinación de glicoles por cromatografía gaseosa	124
Desarrollo del método cromatográfico	124
Validación analítica	126
Linealidad y sensibilidad	126
Precisión y exactitud	127
Estabilidad y robustez	128

Conclusiones sobre el método.....	131
Producción de PDO en mutantes de reguladores globales.....	132
Síntesis de PDO en medio mínimo M9	132
Síntesis de PDO en medio rico	133
Síntesis de PDO en cultivos de la cepa Δ cra a partir de glucosa y glicerol	135
Estadística multivariada para el análisis de patrones fenotípicos.....	137
Variables consideradas en el análisis	137
Análisis por componentes principales y análisis discriminante	137
Determinación de distancias entre cepas por Análisis de Agrupación Jerárquica	139
Discusión y conclusiones.....	140
Producción de biocompuestos.....	140
Diferencias con la cepa K1060	141
Análisis estadístico	142
CAPITULO III. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO SUCCÍNICO Y 1,3-PROPANODIOL	
.....	143
Prefacio	144
Optimización de la producción de succinato en mutantes Δcra	146
Estrategias para la optimización de la producción de succinato	146
Efecto de las enzimas carboxilantes sobre la síntesis de ácido succínico	147
Optimización del medio de cultivo	148
Efecto de la sobreexpresión de fdh1	151
Combinación de las enzimas Pck y Fdh	151
Discusión y conclusiones parciales.....	152
Estudio de la optimización de la síntesis de PDO	154
Fundamentos de la estrategia.....	154
Efecto de la sobreexpresión de phaP sobre la síntesis de PDO	154
Producción de PDO en cultivos en biorreactor	158
Optimización de la estrategia de alimentación: lote vs. lote repetido	159
Optimización del medio de cultivo: medio SDM	161
Ensayos preliminares en frasco agitado	161
Cultivo en lote repetido en cepas Δ arcA y Δ arcA+PhaP	163

Discusión y conclusiones parciales.....	164
CONCLUSIONES FINALES.....	167
Impacto de la manipulación de genes regulatorios globales sobre el metabolismo y la respuesta a estrés	167
Tolerancia.....	167
BW25113 vs K1060	168
Producción recombinante de compuestos reducidos	168
Fenotipos particulares entre las distintas mutantes	171
BIBLIOGRAFÍA	175

Resumen

La manipulación de reguladores globales es una de las estrategias utilizadas para la construcción de cepas bacterianas adecuadas para la síntesis de bioproductos, debido a que este tipo de reguladores controlan, de forma conjunta, los flujos de carbono y poder reductor. Sin embargo, los efectos pleiotrópicos de estos reguladores pueden variar en diferentes condiciones y a menudo dependen de la cepa de trabajo. En este estudio se analizaron los efectos de ArcA, CreC, Cra y Rob usando mutantes de delección única de la cepa BW25113 de *Escherichia coli* (*E. coli*), la cual está bien caracterizada y completamente secuenciada. La comparación de los efectos de cada regulador sobre la síntesis de los principales metabolitos extracelulares, la tolerancia a varios compuestos y la síntesis de bioproductos nativos y no nativos en diferentes condiciones de crecimiento permitió la discriminación de los fenotipos particulares que se pueden atribuir a las mutantes individuales, y destacó a las mutantes Δcra y $\Delta arcA$, en las que se observaron los efectos más importantes sobre el metabolismo bacteriano. A partir de estos datos, en una prueba de concepto para analizar si sus contextos metabólicos eran adecuados para la síntesis de los biocompuestos reducidos, se utilizaron estas cepas como plataformas para la síntesis de succinato y 1,3-propanodiol (PDO). La mutante Δcra se modificó adicionalmente para potenciar la síntesis de succinato mediante la adición de enzimas que aumentan la disponibilidad de NADH y CO₂, logrando un aumento del 80% en comparación con la cepa salvaje. La producción de PDO en la mutante $\Delta arcA$ se optimizó mediante la sobreexpresión de la proteína PhaP, que permitió un aumento del 230% en la síntesis del diol en comparación con la cepa salvaje. En un medio semidefinido, usando glicerol como fuente de carbono, los cultivos en biorreactor de esta cepa alcanzaron 24 g.L⁻¹ de PDO después de 48 h, con una productividad volumétrica de 0,5 gL⁻¹h⁻¹.

Palabras clave: reguladores globales, ArcA, Cra, PhaP, 1,3-propanodiol, *Escherichia coli*

Abstract

Manipulation of global regulators is one of the strategies used for the construction of bacterial strains suitable for the synthesis of bioproducts. However, the pleiotropic effects of these regulators can vary in different conditions and are often strain dependent.

In this study analyzed the effects of ArcA, CreC, Cra and Rob using single deletion mutants of the well characterized and completely sequenced *Escherichia coli* (*E. coli*) strain BW25113. Comparison of the effects of each regulator on the synthesis of major extracellular metabolites, tolerance to several compounds and synthesis of native and non-native bioproducts in different growth conditions allowed the discrimination of the particular phenotypes that can be attributed to the individual mutants, and singled out Cra and ArcA as the regulators with the most important effects on bacterial metabolism. These data were used to identify the most suitable backgrounds for the synthesis of the reduced bioproducts succinate and 1,3-propanediol (PDO). The Δ cra mutant was further modified to enhance succinate synthesis by the addition of enzymes that increase NADH and CO₂ availability, achieving an 80% increase compared to the parental strain. Production of PDO in the Δ arcA mutant was optimized by overexpression of PhaP, which increased more than twice the amount of the diol compared to the wild type in a semi-defined medium using glycerol, resulting in 24 g.L⁻¹ of PDO after 48 h, with a volumetric productivity of 0.5 g.L⁻¹h⁻¹.

Key words: global regulators, ArcA, Cra, PhaP, 1,3-propanediol, *Escherichia coli*

Introducción

INTRODUCCIÓN.

Regulación génica en *Escherichia coli*

Los organismos deben poder adaptarse al medio que los rodea para poder sobrevivir. En particular deben poder sentir y responder a los cambios a los cuales están sometidos. Estos cambios pueden estar relacionados a factores indispensables para la vida, como la disponibilidad de los nutrientes C, N, P, O₂ (Kivisaar 2003). Las bacterias, a pesar de ser organismos simples desde el punto genético, poseen en su genoma miles de genes, cuya activación debe ser orquestada de forma adecuada para sentir y responder a dichos cambios ambientales lo más rápido posible. La regulación génica, es el mecanismo principal, mediante el cual un organismo puede adaptarse al medio que lo circunda. En las bacterias, existen diferentes tipos de regulación dependiendo del nivel donde se produzca el control, que va desde la estructura del cromosoma hasta la estabilidad proteínica. La regulación transcripcional es el tipo de regulación más común y mejor estudiada en estos organismos, y está controlada a través de los reguladores transcripcionales, que al unirse a una secuencia de DNA pueden activar o reprimir la expresión de sus genes diana (Snyder 2013). La mayoría de las respuestas a estrés o cambios ambientales implican diversas redes metabólicas, distintos niveles regulatorios y una batería de reguladores que incluyen la mayoría de los reguladores llamados globales. Estos últimos son reguladores jerárquicos que controlan, directa o indirectamente, numerosos genes y operones simultáneamente (Snyder 2013).

Regulación global en *Escherichia coli*

La velocidad de respuesta a estímulos es muy importante. Muchas veces las condiciones del ambiente no sólo son variables, sino que cambian abruptamente. Las bacterias deben ajustar rápidamente la síntesis de sus componentes celulares, la tasa de crecimiento dependiendo de las fuentes de carbono y energía disponibles, la síntesis de macromoléculas y un sinnúmero de funciones que hacen a la viabilidad de la célula (Pollack 2002). Esta interacción implica, como dijimos más arriba, una compleja red de transportadores, mecanismos de transducción de señales y la expresión de genes, operones, incluso regulones y estimulones (Schaechter 2001). La posibilidad de responder a muchas señales simultáneas, necesaria para ajustarse a las condiciones del medio, se logra mediante la acción concertada de múltiples reguladores que actúan a diferentes niveles jerárquicos. La mayoría de los reguladores son a su vez regulados por los de nivel jerárquico superior, y regulan

a otros de nivel jerárquico inferior. Los reguladores de mayor nivel se denominan reguladores globales, y son los que afectan de manera directa o indirecta a todos los genes de un organismo (Figura 1). Estos reguladores fueron definidos por sus fenotipos pleiotrópicos sobre el metabolismo y la fisiología bacteriana. Estos factores de transcripción regulan de forma simultánea un gran número de genes que pueden pertenecer a diferentes operones y grupos funcionales (Gottesman 1984). En *E. coli*, la bacteria más estudiada hasta el presente y cuya red de regulación transcripcional es la más conocida, 7 reguladores globales (ArcA, Crp, Fis, Fnr, Ihf, Lrp, y NarL) controlan más de la mitad de todos los genes (Martínez-Antonio y Collado-Vides 2003). Numerosos trabajos revelan que gran parte del orquestado de la respuesta celular tiene que ver con la regulación ejercida por estos reguladores globales, poniendo en evidencia la compleja interrelación de factores que se pone en funcionamiento para dar respuesta a estímulos ambientales (Keren 2013, Kochanowski 2017). En particular, la regulación global es clave en el funcionamiento del metabolismo central, siendo los principales efectores los reguladores globales ArcA, Cra y Crp (Perrenoud 2005, Kochanowski 2017).

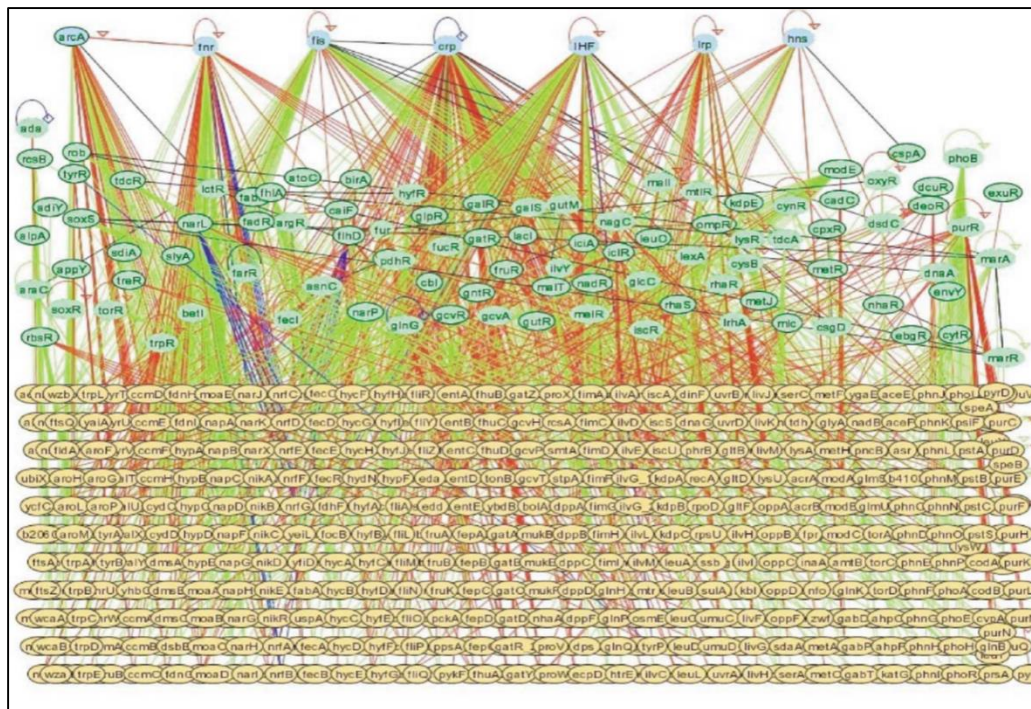


Figura 1. Red regulatoria de *E. coli*.

Reguladores globales: círculos azules. Factores de transcripción: círculos verdes. Genes regulados: círculos amarillos. Las líneas verdes indican activación y las rojas, represión. Las líneas negras indicar regulación dual. Tomado de Agustino Martínez-Antonio y Julio Collado-Vides 2003.

ArcAB: regulación de la respuesta de adaptación metabólica a la disponibilidad de oxígeno en *E. coli*

Generalidades

Dado que la atmosfera primitiva carecía de O₂ molecular, la fermentación pudo haber sido la más antigua (o una de las más antiguas) forma de obtener energía por parte de las células (Walker 1980). Todas las células experimentan cambios significativos cuando pasan de un ambiente aeróbico a uno anaeróbico o viceversa. Los organismos capaces de adaptarse a ambientes con diferente disponibilidad de O₂, como los aerobios facultativos, experimentan un cambio adaptativo tanto en su metabolismo como en la expresión génica. Esto tiene sentido en pos de asegurar una coherencia entre la demanda y la disponibilidad de O₂. Existen otros ejemplos de adaptación a cambios en la disponibilidad de O₂ como el desarrollo de patógenos luego de la invasión de tejidos al disminuir la concentración de este gas (Mahan 1996) o la iniciación de la fotosíntesis en bacterias púrpura del azufre (Cohen-Bazire 1957).

Percepción de la disponibilidad de oxígeno en Enterobacteriaceae

Por lo menos ocho proteínas (SoxR, OxyR, Hmp, Aer, DsbB, Dos, Fnr, y ArcB) controlan las complejas respuestas moleculares y fisiológicas que se inducen en *E. coli* como consecuencia a cambios en la disponibilidad de oxígeno, permitiendo a esta bacteria aerobia facultativa optimizar su metabolismo. Muchos de ellos modulan la respuesta al estrés oxidativo que tiene lugar durante el metabolismo aeróbico, el cual genera especies reactivas del O₂ (ERO) (Hengge-Aronis 2000). Tanto SoxRS como OxyR regulan este fenómeno de protección a nivel transcripcional en *E. coli* (Aslund 1999).

Sin embargo, existe una adaptación mucho más compleja en el metabolismo bacteriano como consecuencia del consumo de oxígeno del medio circundante durante el crecimiento celular (Smith y Neidhardt 1983 a, b). El metabolismo catabólico de *E. coli* en condiciones aeróbicas o anaeróbicas indudablemente requiere de distintas vías metabólicas. Las enzimas involucradas en cada vía metabólica están reguladas a nivel transcripcional y a nivel enzimático. Alrededor de 30 operones (alcanzando 70 genes) son modulados por el regulador Fnr (*fumarate and nitrate respiration*) (Lynch y Lin 1996 a) y, al menos 40 operones son controlados transcripcionalmente por acción del sistema de dos componentes ArcAB (por *anaerobic redox control*). Estos dos reguladores globales son los

efectores más importantes del control de la expresión de genes catabólicos, y en muchos casos operan en forma coordinada para lograr una regulación fina del catabolismo en respuesta a las condiciones redox y la disponibilidad de oxígeno en el medio (Green y Paget 2004).

ArcAB pertenece a la numerosa familia de sistemas de transducción de señales de dos componentes en bacterias (Parkinson y Kofoed 1992), un tipo de control muy difundido en bacterias, en los cuales la tarea de detectar la señal y dar una respuesta están asignadas a cada uno de dichos componentes. Las proteínas del primer componente, en este caso ArcB, actúan como el sensor de la señal, y pertenecen a una extensa familia de histidina quinasa que se autofosforilan cuando son activadas por la señal apropiada (Figura 2). El segundo elemento es el regulador de la respuesta, ArcA en este ejemplo, y es generalmente un miembro de la familia de los factores de transcripción, el cual se ve activado por la fosforilación de un residuo de aspartato con un fosfato donado por la fosfohistidina del sensor de la señal y son capaces de unirse al DNA para modular la transcripción génica (Stock 1990) (Figura 2, Figura 3). En general, ArcAB reprime las funciones asociadas a la respiración aeróbica, así como la expresión génica de varias enzimas del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA). ArcA y ArcB controlan la expresión de al menos 135 genes (Lynch y Lin 1996a), aunque estudios recientes muestran que dicho número podría incrementarse a más de 1400 genes regulados directa e indirectamente (Salmon 2005), la mayoría de los cuales están involucrados en el catabolismo aeróbico y anaeróbico.

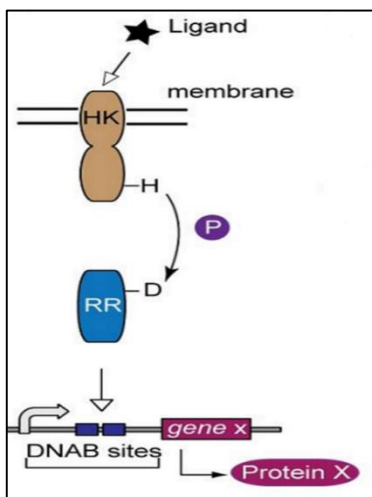


Figura 2. Mecanismo de acción de los sistemas de dos componentes.

Tomado de Hansen J et al. 2014, Transplantation of prokaryotic two-component signaling pathways into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 111 (44):15705-15710.

El sensor de membrana ArcB

Como ya dijimos, en *E. coli* existen numerosas proteínas cuya actividad responde a variaciones en el nivel de oxígeno y que no requieren de co-factores, entre ellas ArcB. Actualmente se cuenta con

información experimental suficiente para explicar el mecanismo de acción del sistema ArcAB en respuesta a cambios en la concentración de oxígeno (Malpica 2006). La evidencia experimental muestra que el nivel de oxígeno sería detectado a través de cambios en la relación que existe entre quinonas oxidadas y reducidas (como en la forma quinol) (Georgellis 2001, Malpica 2004). Cabe destacar que existe, además, evidencia molecular y fisiológica que indica que el sistema Arc es capaz de responder a más de un estímulo (Alexeeva 2000); entre otros, puede citarse la disponibilidad de poder reductor NADPH. Una vez percibido el estímulo, ArcB se autofosforila y luego trans-fosforila al regulador ArcA (generando ArcA-P (Figura 3) (Georgellis 1997). Este es el motivo por el cual ArcAB ejerce un efecto importante en condiciones microaeróbicas de crecimiento.

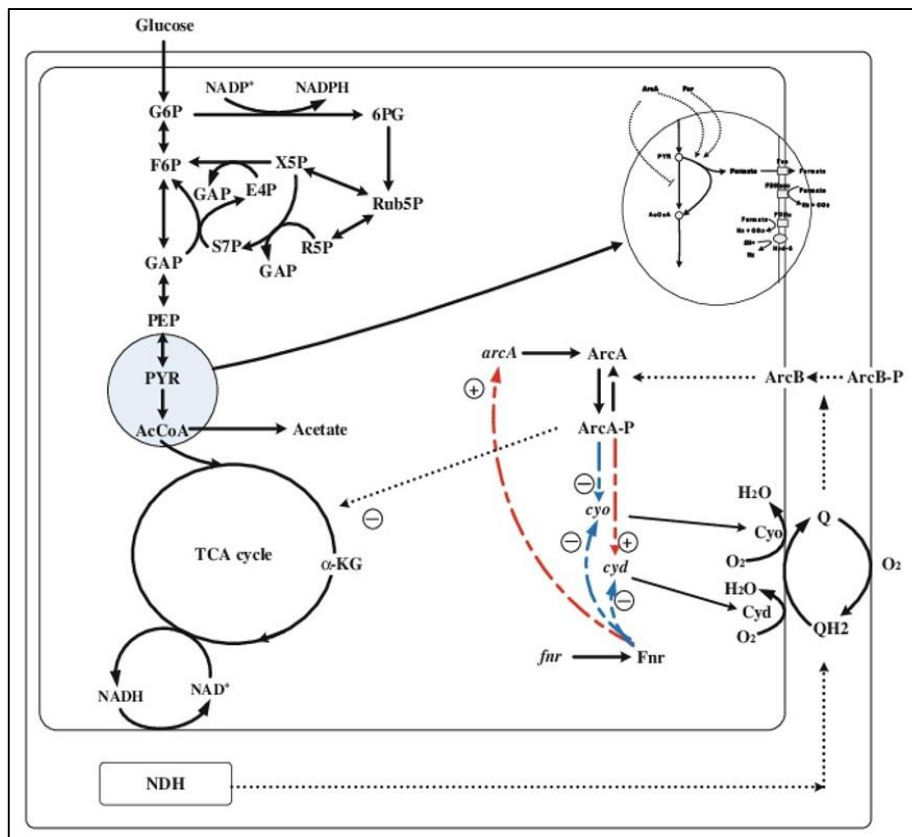


Figura 3. Sistema de dos componentes ArcAB.

ArcB sensa la disponibilidad de O_2 en función de los niveles de quinonas reducidas, se autofosforila y luego transfosforila a ArcA. ArcA-P puede luego unirse al DNA y modular la expresión de los genes a la respiración celular. Q: quinonas oxidadas, QH_2 : quinonas reducidas. Tomado de Shimizu et al 2016.

ArcA, regulador de la respuesta

El regulador citoplasmático ArcA (codificado por el gen *arcA*, también conocido como *dye*, *sfrA*, *fexA*, *msp*, o *seg*) posee un efecto pleiotrópico sobre numerosas funciones celulares (Iuchi y Lin 1988). En respuesta a cambios en la disponibilidad de oxígeno, ArcA modula la expresión génica de varios genes cuyos productos están involucrados en el catabolismo (Lynch y Lin 1996a), genes de

resistencia a colorantes redox (por ejemplo: azul de metileno y azul de toluidina) (Roeder y Somerville 1979) y la expresión de los genes de transferencia de DNA (genes *tra*) del plásmido F (Buxton y Drury, 1983). Más tarde el regulón de ArcAB continuó extendiéndose y se sabe que modula negativamente o positivamente la expresión de numerosos genes en *E. coli*, que codifican, entre muchas otras proteínas, varias deshidrogenasas de tipo flavoproteína, los complejos citocromo-oxidasas terminales Cyo y Cyd, las enzimas del ciclo TCA, de la vía del glioxilato, y enzimas involucradas en la degradación de ácidos grasos (Iuchi 1990, Salmon 2005).

ArcA posee un dominio C-terminal hélice-giro-hélice (HTH) de unión al DNA y, aunque no posee una secuencia consenso estricta de unión, se ha postulado que una posible secuencia sería 5'-[A/T]GTTAATTA[A/T]-3' (Lynch y Lin 1996b). Los sitios de unión de ArcA están localizados tanto río arriba como río abajo de los promotores blanco, y exhiben diferentes grados de afinidad para la forma fosforilada y no fosforilada de ArcA *in vitro* (Shen y Gunsalus 1997).

El regulador global CreCB

Mecanismo de acción

Originalmente se designó a CreC como PhoM, del cual se sabía que era capaz de actuar como dador de fosfato a PhoB, un regulador que controla la expresión del regulón *pho*, relacionado con la homeostasis del fosfato y cuyo control está ejercido por el sistema de dos componentes PhoBR (Wanner 1996). En mutantes nulas del gen *phoR*, la activación del regulón *pho* depende de CreC, el cual no responde a las concentraciones de fosfatos inorgánicos intracelulares, sino a la fuente de carbono en el medio de cultivo.

En base a estos hallazgos, se sugirió que la función normal de CreC es la de monitorear cambios en la presencia de carbono y debido a que sólo regula a PhoB en ausencia de PhoR, su función se consideró superflua en cepas salvajes (Wanner 1996). En estudios posteriores Cariss y col. 2008, intentaron determinar el ligando de activación de CreC con mayor precisión. Estudiando la actividad del gen *creD* como gen reportero en ensayos de β -galactosidasa, observaron que en presencia de medio mínimo suplementado con piruvato, formiato y malato (en mayor medida), o con lactato y acetato (de forma más moderada), la expresión de CreD aumentaba significativamente en condiciones aeróbicas de crecimiento (Cariss 2008). No sucedía lo mismo cuando la fuente de carbono era arabinosa, fructosa, gluconato, o glucosa, aunque esta última sí era capaz de inducir la expresión de *creD* en condiciones microaeróbicas. El efecto de la glucosa tiene que ver,

probablemente, con la fermentación que da lugar a la formación de los ácidos orgánicos. Como conclusión, los autores de este trabajo sugieren que el ligando responsable de la activación de CreC es un metabolito intermediario presente en altas concentraciones durante la fermentación de la glucosa y durante el crecimiento en fuentes de carbono gluconeogénicas. Por otro lado, deja establecido que la delección de *creC* reprime la activación del operón *cre* en condiciones aeróbicas utilizando piruvato como la única fuente de carbono o bajo condiciones anaeróbicas y glucosa como fuente de carbono.

Por su parte, CreB es un activador transcripcional que actúa reclutando a la RNA polimerasa de forma similar a la de otras proteínas con dominio *winged-helix*, como sucede con los reguladores de respuesta PhoB y ArcB.

Regulón *cre* y su efecto sobre el metabolismo

Por muchos años luego del descubrimiento de CreBC, no hubo ningún hallazgo respecto de la identificación de los genes del regulón *cre*. La clave para la detección de algunos miembros de este regulón fue provista por la observación de que existía alta similitud de secuencia entre el sistema CreBC de *E. coli* y el sistema de transducción de señales de dos componentes BlrAB de *Aeromonas hydrophyla* (Avison 2001). Avison y col. encontraron que el nivel de expresión de *ceph*, *imiH* y *amph* era dependiente de CreBC cuando los tres genes se clonaban junto a sus secuencias regulatorias en *E. coli* DH5 α . De esta manera fue posible definir la secuencia de reconocimiento *cre/blr* TTCACnnnnnnTTCAC localizada en posición -60 respecto del sitio de inicio de la transcripción. Una búsqueda bioinformática reveló que existen 8 unidades transcripcionales en el genoma de *E. coli* que contienen esta secuencia en su zona promotora. A la fecha, los genes en los que se ha visto activación por parte de este regulador global son *ackA-pta* (codifican las enzimas acetato quinasa y fosfotransacetilasa), *talA* (transaldolasa A, enzima de la vía no oxidativa del ciclo de las pentosas fosfato), *radC* (cuyo producto está involucrado en la reparación del DNA dependiente de RecA), *trgB* (una ADP-ribosa pirofosforilasa), *yieI*, *yidS* (ambas sin función asignada) y *creD*. La expresión de *malE*, cuyo producto es un componente del transportador de maltosa, es reprimida por CreBC. Además, hay evidencias sobre la regulación de los genes *cbrA* y *cbrB* (Avison 2001). Estos genes están potencialmente relacionados a resistencia a colicina, entre otros antibióticos. Estudios más recientes, realizados mediante microarreglos de DNA, revelaron que CreBC afecta la expresión de los genes: *cbrC*, también relacionado a la resistencia a colicina; E2mokB, un péptido regulatorio; y los genes *mppA*, *ynal*, *yafU* y *yafE*, cuya función no se conoce (Cariss 2010).

Sumado a los genes controlados por CreBC relacionados con el metabolismo intermedio del carbono, debe mencionarse un estudio muy reciente en nuestro laboratorio que mostró que mutantes $\Delta creC$ de *E. coli* K1060 mostraron un perfil metabólico diferente con respecto a la cepa salvaje, con aumentos en varios ácidos orgánicos y en particular, ácido succínico cuando las cepas fueron crecidas en medio mínimo y glucosa en diferentes condiciones de aireación (Godoy 2016). Además, estos estudios arrojaron evidencias del control de este regulador sobre la actividad de Ldh y Ack, las cuales eran mayores en condiciones de O₂ limitado, con respecto a la cepa salvaje. En 2009, Nickel y col. demostraron, mediante análisis de flujo de carbono en cultivo continuo bajo limitación de O₂ y glucosa (como única fuente de carbono), que mutantes $\Delta creB$ tenían una disminución del flujo de carbono en la vía de las pentosas fosfato, el ciclo de Krebs y la parte baja de la glucólisis. En particular CreB junto con ArcA parecían modular en conjunto la actividad de las enzimas Pfl, PDHc, Ldh y Ack (Nickel 2009).

Regulación global del flujo de carbono: Cra y Crp

Uno de los sistemas regulatorios más importantes en bacterias es el que coordina la expresión de genes involucrados en la utilización de fuentes de carbono y energía, dado que todas las células los necesitan para generar ATP y moléculas más pequeñas que sirvan como bloques de construcción para la síntesis de componentes celulares (Snyder 2013).

Represión catabólica

La mayoría de las bacterias pueden utilizar varias fuentes de carbono y energía diferentes. Cuando el crecimiento se da en un medio que tiene más de una fuente de carbono, estas pueden ser cometabolizadas o utilizarse de manera preferencial. Un claro ejemplo de esto son las curvas de diauxia descritas hace ya muchos años por Monod con respecto al crecimiento de *E. coli* en presencia de una mezcla de glucosa y lactosa (Monod 1942). Se ha visto que este mecanismo es muy común en bacterias y generalmente implica que la fuente de carbono que se utiliza primero es aquella que es más accesible por parte de la célula y permite un crecimiento rápido por su rendimiento energético superior. Esta fuente de carbono preferida, que suele ser la glucosa, impide la utilización de sustratos secundarios o más pobres en cuanto a su rendimiento. Este efecto se conoce como represión catabólica o CCR (por las siglas en inglés de *carbon catabolite repression*) (Magasanik 1961). En una definición más amplia, la CCR es entendida como la represión de operones

y genes necesarios para la degradación de fuentes de carbono secundarias y la disminución de la actividad de enzimas que tienen que ver con estas funciones en presencia de una fuente de carbono preferida.

La CCR es una de las redes regulatorias más importantes en las bacterias, ya que en muchas especies bacterianas se ha observado que del 5 al 10% de todos los genes de son afectados por este mecanismo de represión (Gorke 2008). En la naturaleza uno de los factores determinantes del éxito con que un organismo puede adaptarse y establecerse en un nicho es la velocidad con la que puede crecer, estrechamente relacionada con la capacidad de utilizar sustratos carbonados. Esto pone de manifiesto la importancia de la CCR. La necesidad de crecer de la forma más eficiente es justamente el motor evolutivo de este sistema regulatorio. La mayoría de las bacterias heterotróficas poseen CCR, incluyendo a bacterias autotróficas facultativas que interrumpen la fijación de CO₂ en presencia de fuentes de carbono preferidas. Sin embargo, existen bacterias que no poseen CCR, como algunas bacterias patógenas. Otras como *Corynebacterium glutamicum* pueden cometabolizar azúcares y otras exhiben una CCR reversa, donde la glucosa es una fuente alternativa de carbono, como sucede en *Pseudomonas aeruginosa* (Gorke 2008).

Mecanismo de acción

Mientras que la existencia de la CCR es general, los mecanismos que llevan a la represión pueden ser bastante distintos. La presencia de una fuente de carbono preferida puede resultar en bajas concentraciones de los inductores de vías catabólicas alternativas, en la actividad alterada de reguladores específicos, o en la activación de proteínas regulatorias globales. La principal causa del uso preferencial de azúcares se da al impedir la inducción específica de los genes catabólicos. Mediante procesos como la exclusión del inductor, expulsión del inductor o el control de la actividad de reguladores a través de la fosforilación, la presencia de azúcares preferidos va en detrimento de la expresión de rutas alternativas de utilización de sustratos secundarios (Brückner y Titgemeyer 2002).

Una de las consecuencias mejor estudiadas de la disponibilidad de hidratos de carbono es la activación de sistemas de control transcripcionales globales, los cuales son mecanísticamente diferentes en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Mientras que en las bacterias entéricas se detona un mecanismo de activación que usa a la proteína CAP o CRP (por *cyclic AMP receptor protein*), en bacterias Gram-positivas existe una regulación negativa mediada por CcpA (Brückner y Titgemeyer 2002).

Sistema PTS

La forma en la que los hidratos de carbono son incorporados por la bacteria, clave en la CCR, puede diferir mucho dependiendo de las proteínas involucradas en el transporte. La mayoría de los hidratos de carbono entran a la célula en la forma fosforilada. El transporte y consecuente fosforilación se realizan mediante componentes del sistema de fosfotransferasas de carbohidratos (PTS) dependiente de fosfoenolpiruvato (PEP) (Postma 1993). Este sistema consiste en permeasas de azúcares, también denominadas como enzimas II (EII), y dos proteínas generales, enzima I (EI) y la histidin-proteína (HPr), que participan en la fosforilación de todos los hidratos de carbono transportados por el PTS (Figura 4). Las permeasas específicas están compuestas por hasta cuatro dominios (EIIA, B, C, D), de los cuales al menos uno está unido a membrana. Estos dominios proteicos pueden estar separados o juntos como una sola cadena polipeptídica. La permeasa de glucosa de *E. coli*, la cual consiste en una proteína unida a membrana (EIICBglc) y una citoplasmática (EIAGlc) es quizás la permeasa del PTS mejor conocida. La cadena de fosforiltransferasa del PTS comienza con EI y PEP, sigue vía HPr, EII y EIIB hasta el azúcar, el cual es transportado por EIIC, y se transforma en un azúcar fosforilado el cual debe ser metabolizado inmediatamente. En cambio, los hidratos de carbono que son interiorizados en una forma no fosforilada, independiente del PTS, necesitan ser fosforilados por una quinasa previamente a ser catabolizados.

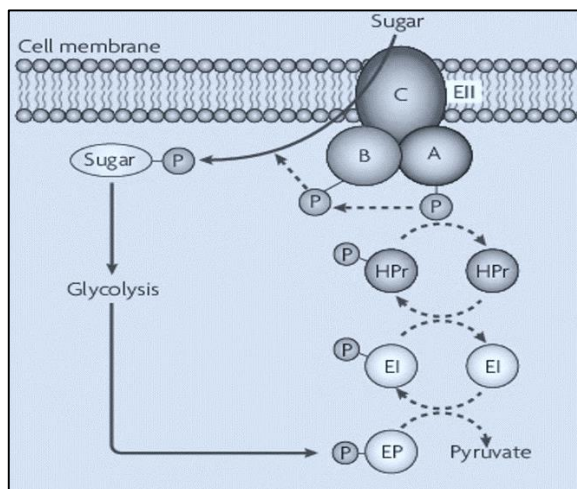


Figura 4. Sistema PTS de bacterias.

Los azúcares son transportados hacia el citoplasma a través de las sucesivas fosforilaciones de las proteínas del PTS utilizando P-EP como sustrato. P-EP: fosfoenolpiruvato. Tomado de Gorke et al 2008.

Represión catabólica en *E. coli*

En *E. coli*, los componentes principales del sistema de represión catabólica son el regulador global CRP, el AMP cíclico (AMPc) y el componente EII A o Crr del sistema PTS (Gorke 2008). La regulación

del sistema se da en principio por la modulación del estado de fosforilación de EII A. Cuando esta proteína está fosforilada es capaz de activar a la enzima de membrana Adenilato ciclasa, la cual convierte el ATP en AMPc. Este último se une a CRP, el cual sufre un cambio alostérico, se une al DNA y recluta a la RNA polimerasa, induciendo la expresión de los genes catabólicos de la bacteria. CRP activa la transcripción de más de 100 promotores y está, en algunos casos, involucrado en la represión (Gorke 2008). CRP está directamente involucrada en la modulación de un gran número de otros procesos celulares que exceden la regulación del uso de hidratos de carbono (Figura 5).

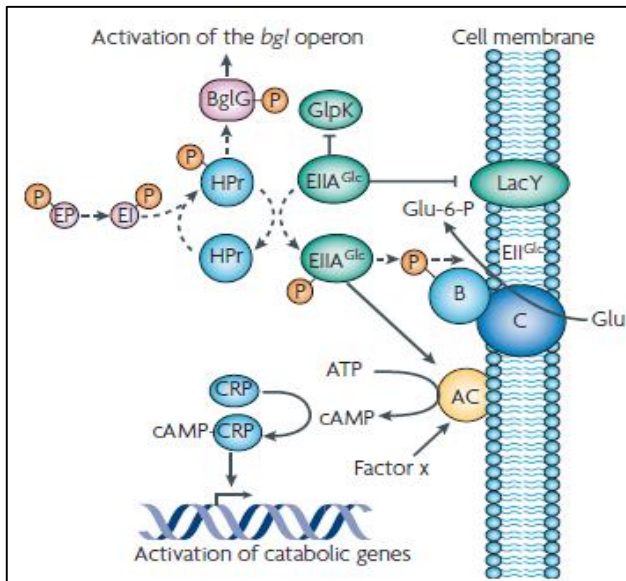


Figura 5. Sistema PTS de E. coli.

El dominio EIIA del transportador de glucosa se fosforila y activa a la adenilato ciclasa, la cual sintetiza AMP cíclico. Altas concentraciones de AMPc activan a CRP y éste activa los operones catabólicos. En presencia de glucosa, EIIA no está fosforilada, no se forma AMPc y Crp permanece inactivo. Además, esta forma de EIIA es capaz de unirse e inactivar transportadores de sustratos secundarios como LacY (permeasa de lactosa) o GlpK (la quinasa de glicerol). Tomado de Gorke y col 2008.

Cuando hay glucosa u otros azúcares dependientes del PTS en el medio, estos son transfosforilados mediante EII A. La relación PEP/piruvato también determina el estado de fosforilación de EII A: cuando esa relación es alta EII A está fosforilada y entonces CRP es capaz de activar genes catabólicos, como dijimos. Sin embargo, cuando la bacteria crece en presencia de una fuente de carbono fácilmente metabolizable como la glucosa, la concentración de piruvato se incrementa y la consecuente disminución de la relación PEP/piruvato impide la fosforilación de EII A, la Adenilato ciclasa no produce AMPc y finalmente CRP no es activado y los genes catabólicos permanecen reprimidos.

En una controversia relativamente reciente sobre la contribución de diferentes mecanismos de CCR a la diauxia glucosa-lactosa de *E. coli*, se ha demostrado que la inhibición de la permeasa de lactosa y la subsiguiente falta de inducción es lo que da origen a la represión del operón *lac* en la presencia de ambos azúcares, más que la represión causada por CRP (Gorke 2008).

Regulación global independiente de AMPc: Catabolite repressor/activator Cra

No siempre la represión catabólica es mediada por el AMPc. De hecho, muchas bacterias Gram-positivas no tienen AMPc. Incluso en las enterobacterias, donde esta establecida la importancia del regulador CRP, existe otro mecanismo de represión catabólica mediado por el regulador Cra (Saier y Ramseier 1996).

Cra, regulador global del flujo de carbono

Desde las décadas de 1970/80, se tenía conocimiento sobre como la proteína CRP unida a AMPc controlaba la represión catabólica en bacterias (Brückner y Titgemeyer 2002) y se consideraba ya que el mecanismo de la utilización de fuentes de hidrato de carbono había sido dilucidado. Sin embargo, hacia fines de los 80 existía evidencia clara de mecanismos de represión catabólica independientes de AMPc en *E. coli* y, sobre todo en *B. subtilis*, donde se observaba el fenómeno de represión aun cuando carecía de AMPc (Dessein 1978).

Uno de estos mecanismos AMPc-independiente es la regulación ejercida por Cra. Este factor de transcripción, miembro de la familia GalR-LacI, ha sido uno de los más estudiados desde finales de la década de los 80. También ha sido denominado FruR, ya que fue descubierto en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*, como el represor del operon *fru*, que codifica para el sistema fosfotransferasa fructosa-especifico (PTS^{fru}) (Chin 1987). En este mismo trabajo, se observó que mutantes de *S. typhimurium*, para el gen *fruR*, mostraban un efecto pleiotrópico al no poder crecer en fuentes de carbono gluconeogénicas, incluyendo intermediarios del ciclo de Krebs. Este efecto era el mismo en distintos contextos genéticos de esta cepa de *Salmonella* y no podía ser revertido mediante mutaciones en otros genes relacionados al sistema PTS.

Se ha observado la existencia del regulador FruR en otras especies bacterianas como *Pseudomonas putida* (Chavarría 2011), *Streptococcus gordonii* (Loo 2003) y *Lactococcus lactis* (Barriere 2005).

Trabajos subsiguientes ampliaron el panorama de la red regulatoria comandada por Cra. La evidencia sobre el cambio de expresión génica en mutantes *fruR*, dejaba ver que FruR era un regulador importante en el control de varios genes involucrados en el metabolismo del carbono y la producción de energía (Chin 1989). Poco más tarde, se hallaron evidencias experimentales sobre la unión de FruR a varios operones relacionados al catabolismo del carbono, entre ellos *pps*, *ace*, *pts*, *icd* (Ramseier 1993, Negre 1998). Además, se observó que este regulador reprimía la síntesis de

genes que codifican enzimas del metabolismo central, entre ellos, *pfkA*, *pykA*, *pykF*, *acnB*, *edd*, *eda*, *mtlADR* y *gapB* (Ow 2007, Sarkar 2008) (Figura 6).

La fructosa es considerada una fuente de carbono importante en cuanto a la evolución de las vías metabólicas de degradación en bacterias debido a varias cuestiones: i) existe un sistema PTS específico para fructosa en *E. coli*, el cual posee una Hrp específica codificada en el operon *fru*, ii) es el único azúcar que ingresa directamente a la glucólisis sin modificaciones iii) muchos géneros de bacterias poseen un PTS^{fru} mientras que son incapaces de fosforilar otros azúcares. A partir de estos estudios se comenzó a postular que FruR podría ser capaz de regular el flujo de carbono, considerando a la glucólisis de forma minimalista como una vía catabólica de fructosa. Además, por regular positivamente genes involucrados en el ciclo de Krebs, la vía del glioxilato y reprimir genes glucolíticos de varios operones, se lo denominó Catabolite Repressor/Activator (Cra) (Saier y Ramseier 1996).

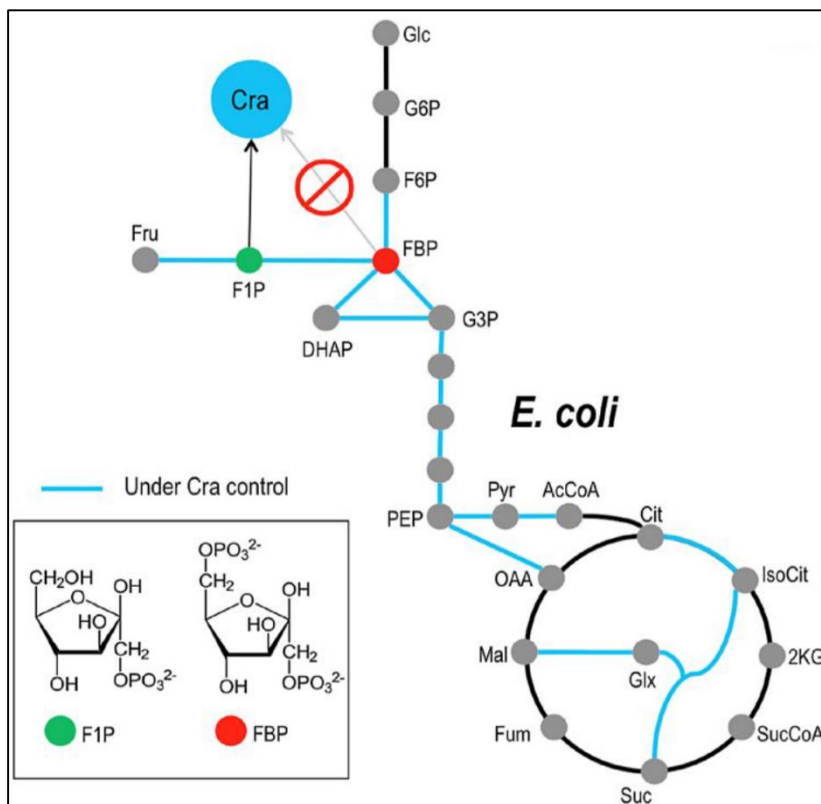


Figura 6. Actividad reguladora de Cra en el metabolismo central en *E. coli*.

El efector de Cra es la fructosa-1-fosfato (F1P), la cual puede interconvertirse con la fructosa bifosfato (FBP). Cuando el regulador está activo, reprime la glucólisis y la vía de las pentosas fosfato; y activa la gluconeogénesis y el ciclo de Krebs. Tomado de Chavarría y de Lorenzo 2018.

Mecanismo de acción

En ausencia de un efector el regulador Cra se comporta como un represor o activador, uniéndose al DNA, activando o reprimiendo la transcripción de los genes que son parte del regulón. La búsqueda

de los posibles efectores dió lugar a varios trabajos, incluyendo algunos muy recientes, y no pocas controversias. Al principio, la bibliografía indicaba que la unión de Cra a las regiones regulatorias de los operones *ppsA*, *icd* y *pts* podía revertirse mediante la presencia de cantidades micromolares de fructosa 1-fosfato (F1P) y concentraciones milimolares de fructosa 1,6-bifosfato (FBP) en experimentos de cambio de movilidad electroforética (Ramseier 1993). Lo cierto es que los autores indicaron la posibilidad de que la FBP utilizada en los ensayos podría estar contaminada con pequeñas cantidades de F1P. Esto fue curioso, ya que esta salvedad no fue tomada en cuenta y se dio por sentado que estos 2 compuestos eran los efectores de Cra. De hecho, el modelado metabólico de Cra y varios trabajos que estudiaron los efectos de Cra sobre el metabolismo central, en particular, algunos que postulan a Cra como un sensor de flujo de carbono a través del metabolito señal del flujo, la FBP, se han servido de este postulado. Esto no carece de sentido, ya que la FBP es considerada como metabolito señalizador de flujo de carbono y correlaciona con el flujo de carbono a través de la glucólisis en *E. coli* y *B. subtilis* (Litsios 2018).

Sin embargo, más tarde experimentos en *P. putida* revelaron que la FBP contenía F1P debido a que al estudiar cristales purificados de Cra, encontraban que la F1P era el azúcar que co-cristalizaba con la proteína. Estudios de dinámica molecular, geles de retardo de movilidad electroforética y actividad in vivo de promotores arribaron a la misma conclusión (Chavarria 2011 y 2014). Finalmente, un trabajo muy reciente realizado en *E. coli* y utilizando FBP ultrapura, mostró, a través de una variedad de análisis, que Cra no puede interactuar con este compuesto mientras que sí lo hace con F1P (Bley-Folly 2018). Esto pone de manifiesto la necesidad de revisar trabajos previos basados en la interacción de Cra con la FBP. Por otro lado, y más importante, queda la pregunta de cómo es que Cra ejerce su efecto respondiendo a F1P. Existen algunos posibles indicios que pueden dar luz a esta cuestión, como por ejemplo que las concentraciones de F1P y FBP están correlacionadas en el metabolismo celular bacteriano. Además, Kochanowski y col. de 2017 obtuvieron evidencia experimental que indica que la F1P está presente en las células aun cuando *E. coli* crece en ausencia de fructosa, y observaron que la correlación entre estos 2 azúcares se mantiene en diferentes condiciones de crecimiento (Kochanowski 2017). Finalmente, la F1P puede ser producida a partir de FBP por la enzima FruK, la cual además interactúa con Cra in vivo (Singh 2017).

Regulón *cra*

Los primeros estudios mecánicos revelaron que Cra es capaz de unirse en forma tetramérica directamente al DNA de los operones que controla (Ramseier 1993, Prost 1999). En base a la secuencia de los genes que pertenecían a su regulón, se obtuvo una secuencia de consenso de unión al DNA, con una clara disposición de los operadores en cuanto a la activación o represión de los genes diana. Específicamente, Cra se une a secuencia palindrómica imperfecta de 14 bases nucleotídicas: 5'-GCTGAAACGTTTCA-3' (Negre 1996).

A partir de las evidencias que indicaban que Cra no era meramente el regulador del operon fructosa, sino que era un regulador global que afectaba la mayoría de los operones involucrados en la glucólisis y el ciclo de Krebs, se comenzó a rastrear otros posibles genes diana de este factor de transcripción. En 2007 mediante proteómica por espectrometría de masas y PCR en tiempo real, Ow y col. determinaron cambios en la expresión de genes en mutantes Δcra en *E. coli*, la mayoría involucrados en el catabolismo de azúcares, pero también genes relacionados con la respuesta a estrés y otros factores de transcripción y genes del metabolismo de aminoácidos (Ow 2007).

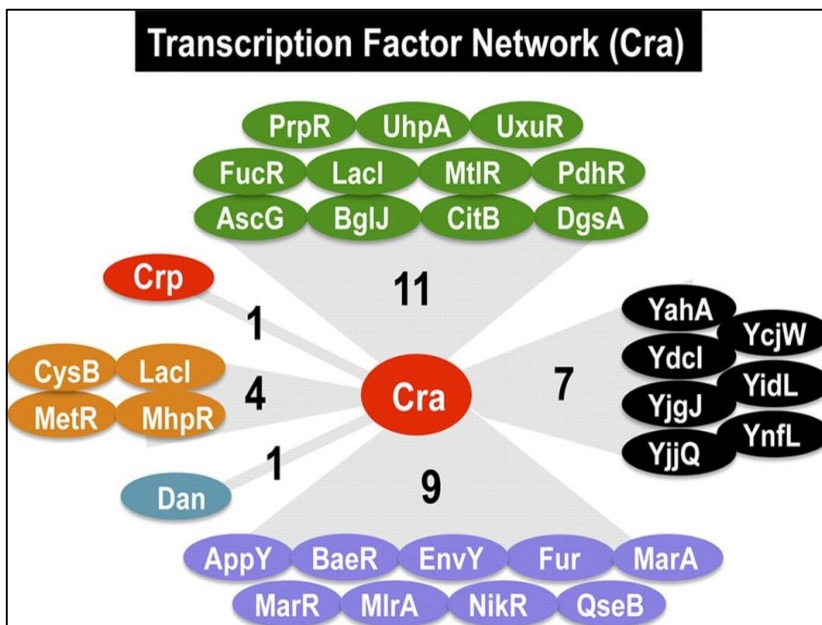


Figura 7. **Factores de transcripción regulados por Cra.**

Verde: reguladores del metabolismo del carbono.
Rojo: reguladores globales del metabolismo del carbono.
Violeta: reguladores de la respuesta a estrés.
Azul: reguladores de reparación del DNA.
Naranja: reguladores del metabolismo de N_2 .
Negro: sin función conocida.
Tomado de Shimada y col. 2011.

Poco después, de la mano de una técnica de evolución de unión a ligando se determinaron los sitios de unión de Cra al DNA a lo largo del genoma, logrando extender considerablemente el regulón de Cra (Figura 7). Una vez más, se identificaron genes relacionados a la respuesta a estrés, factores de transcripción y el metabolismo del nitrógeno (Shimada 2011). Se estableció además una secuencia

consenso basada en más de 160 secuencias en genes diana, y la mayoría de los genes identificados fueron confirmados por fusiones transcripcionales al gen *lacZ* (Shimada 2011).

Además, se sabe que la presencia de Cra es necesaria para la formación de lesiones en los enterocitos por parte *E. coli* enterohemorrágica. Se demostró que este regulador media la activación de la expresión de la isla de patogenicidad en esta bacteria, uniéndose directamente al promotor del gen *ler*, el regulador de esta isla. Además, se vio que mutantes Δcra no pueden infectar efectivamente y destruir enterocitos (Ngoroje 2012).

Quizás un hecho que eleva la jerarquía de Cra en *E. coli* sea que aparentemente puede regular la transcripción de CRP, en sí mismo un regulador global. En 2014, Zhang y col. encontraron un sitio de unión a Cra en la región promotora del gen *crp*. Fusiones transcripcionales del promotor de este gen en mutantes *cra* y la cuantificación de CRP en bacterias salvajes y mutantes mostró que la activación de CRP estaría modulada de forma conjunta por CRP y Cra (Zhang 2014). Hace muy poco tiempo, Kim y col. elucidaron varias cuestiones con respecto al sistema regulatorio de Cra. Mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina y secuenciación de RNA de cultivos de *E. coli* salvaje y su mutante *cra*, crecidos en diferentes fuentes de carbono, lograron establecer que en condiciones donde CRP y Cra están activos, la expresión de los genes involucrados en el metabolismo central del carbono adopta un patrón que concuerda con la modulación regulatoria ejercida por Cra más que por CRP (Kim 2018). Esto fue además reafirmado mediante modelado metabólico y experimentos de flujo de carbono *in silico*. El mecanismo por el cual Cra está un escalón más arriba que Crp en la jerarquía de reguladores estaría dada por el solapamiento de las regiones operadoras de ambas proteínas y el hecho de que Cra se une más fuertemente al DNA disminuyendo el efecto de CRP (Kim 2018).

Rob, regulación del metabolismo intermedio y de la tolerancia a compuestos tóxicos

El regulón MarA/SoxS/Rob

Este regulón es activado por cada uno de los factores de transcripción homólogos MarA, SoxS y Rob, los cuales son reguladores de la familia AraC, subfamilia de los reguladores involucrados en la respuesta a estrés. La activación de este regulón le confiere a *E. coli* un nivel basal de resistencia a un amplio rango de antibióticos, oxidantes y solventes orgánicos (Barbosa y Levy 1997). El gen *marA* es reprimido por MarA en un *feedback* negativo y su expresión se pone en curso cuando este regulador interacciona con compuestos fenólicos. El gen *soxS* es inducido por la forma oxidada de

SoxR (esta oxidación se da por el crecimiento de la célula en presencia de Paraquat y otros oxidantes) (Demple 1996). La actividad de Rob es incrementada por tratamiento con 2,2- o 4,4-dipiridil, lo cual es mediado por la interacción de este compuesto con el dominio carboxilo terminal de este regulador (Rosner 2002).

La evidencia in vitro muestra que los monómeros de cada uno de los reguladores se une a una secuencia consenso asimétrica y degenerada de 20 pares de bases: AYNGCACNNWNNRYAAAYN donde N es cualquier base (Martin 1999). La diferencia cuantitativa del efecto de cada uno de los reguladores sobre la inducción del regulón estaría dada, básicamente, por la diferencia de afinidad de unión a la secuencia consenso de cada uno de los factores de transcripción (Martin 2000). Los primeros trabajos que trataron de identificar el regulón asociado a estos 3 factores de transcripción indicaban que 17 genes estaban bajo activación transcripcional directa (Martin 1999). Sin embargo, trabajos posteriores utilizando microarreglos de DNA evidenciaron el aumento en los niveles de mRNA de más 150 genes, comparando *E. coli* salvaje con una mutante que carecía de MarA (Barbosa y Levy 2000) o comparando niveles de transcripción génica en células tratadas con paraquat o salicilato (Pomposiello 2001). Los datos originados en estos trabajos fueron utilizados para determinar cuáles de los genes identificados eran directamente activados por los reguladores. De los más de 150 genes, sólo pudo determinarse una regulación directa para 7 genes mediante fusiones transcripcionales a *lacZ* e inducción con los compuestos que inducen la expresión de MarA, SoxS y Rob. Estos blancos, sumados a los anteriormente determinados (Martin 1999) indicarían que alrededor de 40 genes son controlados por estos 3 reguladores de forma directa (Martin y Rosner 2003). Estos genes están relacionados con un amplio rango de funciones, entre ellas, el metabolismo intermedio del carbono, la síntesis de pared celular y la resistencia a antibióticos, ácidos y solventes (Benik 2000).

Funciones a asociadas a Rob

Rob fue inicialmente descubierto por su capacidad de unirse al brazo derecho del origen de replicación cromosomal (Skarstad 1993). Su localización genómica es adyacente al operón *creABCD*, cercano a su vez a *arcAB*. Rob está constitutivamente activado en *E. coli*, llegando a 5000 moléculas por célula (Levy 2000). Se ha propuesto que este regulador activa la expresión del operón *marRAB*, relacionado a la resistencia a distintos antibióticos (Martin y Rosner 1997) y se sabe que mutantes nulas de Rob muestran un aumento en la sensibilidad a estrés inducido por solventes orgánicos (Skarstad 1993).

En el 2000, Benik y col. determinaron, mediante una biblioteca de inserciones introduciendo fusiones cromosomales a *lacZ*, que Rob activa la transcripción de 7 genes: *inaA*, *marR*, *aslB*, *ybaO*, *mdlA*, *yfhD* y *ybiS*. Además, pudieron evidenciar la represión del gen *galT*. Estos resultados fueron confirmados en ese mismo trabajo por ensayos de cambio de movilidad electroforética. Además, demostraron que la expresión de *micF* era significativamente mayor en la cepa salvaje comparada con la mutante Δrob . Este RNA antisentido reprime la síntesis de OmpF, una porina de membrana externa. Otro de los blancos identificados de Rob, *inaA*, está relacionado con la resistencia a estrés inducido por ácidos débiles (Ariza 1995). Los genes *mdlA* y *micF* también están involucrados en la respuesta a estrés ambiental (Benik 2000). Además, podemos mencionar que Rob junto con MarA y SoxS, regulan la expresión de los genes *acrAB*, que codifican la bomba de eflujo AcrAB-TolC, la cual constituye uno de los principales mecanismos de tolerancia a solventes orgánicos y antibióticos en *E. coli* (White 1997). Vale la pena mencionar que los genes *aslB*, *ybaO* y *ybiS* son en sí mismo factores de transcripción, con lo cual la red regulatoria de Rob podría ser considerablemente más extensa de forma indirecta (Benik 2000). A esto podemos agregar que la sobreexpresión in vitro de Rob activa los genes *fumC*, *inaA*, *micF* y *sodA* (Ariza 1995); y experimentos in vivo revelaron, además, la regulación de *fpr*, *fumC*, *nfo* y *zwf* (Jair 1996). Los genes *zwf* y *galT* están relacionados con el metabolismo central e intermedio del carbono, respectivamente. *galT* es clave en el metabolismo de galactosa e interviene en la síntesis de glicoproteínas, glicolípidos y pared celular (Frey 1996). *Zwf* es la primera enzima de la vía de las pentosas fosfato, produce una parte importante del NADPH intracelular y tiene efectos significativos sobre el flujo de carbono (Nicolas 2007).

Sobreexpresión de Rob en *E. coli*

Si bien Rob tiene una expresión basal en *E. coli* y genera una leve tolerancia a diversos tipos de estrés, la delección de este regulador sólo causa una cierta sensibilidad a solventes orgánicos. Por el contrario, la sobreexpresión de esta proteína tiene consecuencias evidentes sobre el fenotipo de esta bacteria. La sobreexpresión de este regulador aumenta significativamente la tolerancia a solventes orgánicos como ciclohexano y pentano, a antibióticos y distintos metales pesados (Nakajima 1995). También se ha observado el incremento de la tolerancia a compuestos como la fenazina metasulfato, la cual induce estrés oxidativo (Tanaka 1997).

Estos resultados son similares al patrón de tolerancia que se produce cuando MarA o SoxS son sobreproducidos (Asako 1997). Esto claramente concuerda con el hecho de los regulones de estos 3 factores de transcripción están altamente solapados, como vimos unas secciones más arriba.

El incremento de la tolerancia a distintos compuestos tóxicos tiene su base bioquímica y genética en relación a los genes regulados por Rob: i) la regulación de AcrAB, bomba de eflujo que media resistencia multidroga, ii) el control de la expresión de *sodA* y *fumC*, que confieren protección frente al estrés oxidativo y iii) la activación de *inaA* y *micF*, que también confieren mayor resistencia a condiciones ambientales.

Reguladores globales como herramientas biotecnológicas

Como vimos hasta aquí, la mayor parte de las bacterias son capaces de vivir y adaptarse a numerosas condiciones ambientales diferentes, desplegando varios grados de flexibilidad metabólica. Un ejemplo claro es la capacidad de *E. coli* de modificar sus vías metabólicas para optimizar el uso de distintos aceptores de electrones o fuentes de carbono (Bettenbrock 2014, Shimizu 2015). Las propiedades termodinámicas y bioquímicas del medio donde las células están creciendo determinan que vías metabólicas se ponen en funcionamiento (Flamholz 2013). En el caso del metabolismo, por ejemplo, hay varios tipos de glucólisis. El metabolismo de la glucosa refleja un equilibrio entre la generación de ATP y el gasto energético que implica la utilización de la maquinaria enzimática necesaria para degradarla. Desde este punto de vista, organismos como *Zymomonas mobilis* y especies de *Pseudomonas*, utilizan la vía Entner-Doudoroff en lugar de la convencional Embder-Meyerhof, utilizada mayoritariamente en *E. coli*, debido al menor requerimiento de enzimas (Flamholz 2013). En definitiva, más allá de estas consideraciones, la elección de las vías metabólicas más convenientes reside en la red regulatoria compuesta por factores de transcripción específicos y globales (Shimizu 2015).

Recientemente, numerosos hallazgos experimentales y de modelado metabólico han puesto de manifiesto la influencia de la regulación global frente a los estímulos externos por encima de la regulación de factores de transcripción específicos de cada unidad transcripcional:

- i) experimentos de microchips de DNA y técnicas de secuenciación han demostrado que cambios en las condiciones de cultivo de las bacterias, provocan cambios en la expresión de una enorme cantidad de genes, incluso cuando esos cambios parecen ser menores (Costenoble 2011, Tirosh 2011).
- ii) Los cambios en la actividad enzimática de varias proteínas tienen que ver principalmente con el cambio global en la tasa de crecimiento (Klumpp 2009). Un estudio sobre más de 1800 promotores en *E. coli* mostró como el cambio en el patrón de expresión se relacionaba

con un factor global que era proporcional al cambio en las condiciones de cultivo y no estaba relacionado a la identidad de cada promotor individual (Keren 2013).

- iii) Los mecanismos de transducción de señales están asociados a reguladores globales, ya sean sistemas de 2 componentes como ArcAB y CreBC o sistemas de 1 componente, donde los factores de transcripción como CRP y Cra, responden a la concentración de metabolitos como F1P, piruvato y PEP (Chubukov 2014)

Para continuar con la comprensión de los mecanismos regulatorios fue necesario entonces intentar diseccionar la contribución de los reguladores globales en la regulación específica, lo cual no es una tarea sencilla. En 2013 Gerosa y col. determinaron, mediante reporteros fluorescentes unidos a promotores cuya regulación es específica o sujetos a regulación global, que ésta última es importante sobre todo cuando las células crecen en fase exponencial mientras que la regulación específica es más importante en el estado estacionario. Más tarde, en 2017, Kochanowski y col. analizaron la actividad de promotores de diferentes genes a través de 26 condiciones de cultivo distintas incluyendo diferentes fuentes de carbono, y aplicando biología de sistemas para modelar el patrón de expresión obtuvieron resultados mecanísticamente simples. A pesar de la compleja y densa red regulatoria de *E. coli*, la acción de los reguladores globales era suficiente para explicar el 70% de los cambios en la actividad de los promotores. Cuando se analizaba los genes relacionados al metabolismo central del carbono en particular, el 90% de los cambios podían explicarse mediante la regulación global ejercida, sobre todo, por los reguladores Cra y CRP.

Por toda la evidencia disponible es posible argumentar que el metabolismo de *E. coli* es controlado por regulación a nivel de actividad enzimática y transcripcional vía factores de transcripción como: AMPc–Crp, Cra, Csr, Fis, PII (GlnB), NtrBC, CysB, PhoR/B, SoxR/S, Cra, MarR, ArcA/B, Fnr, NarX/L, RpoS, y (p)ppGpp, para dar una respuesta específica. Sumado a esto, los metabolitos intracelulares actúan como efectores de los reguladores, donde la FBP (o en realidad la F1P por lo descrito por Bley-Folly y col. en 2018), el PEP y el acetil-CoA juegan roles importantes en la regulación a nivel de proteínas, mientras que los α -cetoácidos, como el piruvato y el oxaloacetato, tienen roles determinantes en la coordinación entre la tasa de consumo de sustratos carbonados y el consumo de otros nutrientes como el N₂ o sulfuros, a través de la modulación de los niveles de AMPc, vía Cya (Shimizu 2015). La extensiva red regulatoria impuesta por este tipo de factores de transcripción mantiene entonces la homeostasis celular controlando simultáneamente el flujo de carbono y poder reductor (Ruiz 2012).

Resulta consecuente, entonces, que los reguladores globales hayan sido objeto del desarrollo de estrategias para manipular el metabolismo del carbono y el balance redox con el objetivo de generar contextos metabólicos adecuados para la producción de compuestos de interés biotecnológico (Pettinari 2008). Esto representa una estrategia alternativa a la manera tradicional de modificar microorganismos a través de mutaciones puntuales en genes que codifican pasos enzimáticos individuales.

Manipulación de flujos de carbono y poder reductor para la síntesis de compuestos biotecnológicos

En el caso de los bioproductos reducidos, es indispensable modificar el flujo de carbono y energía para lograr las condiciones necesarias para su síntesis. Es esta razón por la cual los reguladores globales han sido estudiados y utilizados con el objetivo de redirigir la distribución de carbono y NADH hacia metabolitos de interés industrial, como lo establecimos en la sección anterior.

De nuestros trabajos anteriores en el laboratorio se desprende que el catabolismo central del carbono es regulado, entre otros factores, en forma conjunta por los sistemas ArcAB y CreBC, en especial en condiciones de crecimiento con restricción en la disponibilidad de O₂. Hemos utilizado mutaciones en *arcA* para aumentar la disponibilidad de poder reductor, incrementando la síntesis de diferentes compuestos reducidos como etanol (EtOH) y PHB, en condiciones de baja aireación. Dobles mutantes $\Delta arcA creC^C$ (C: expresión constitutiva), tuvieron un incremento en la síntesis de compuestos reducidos, debido a una mayor tasa respiratoria y generación de poder reductor (Pettinari 2008, Ruiz 2012). Más tarde, la manipulación de CreC dio lugar a un notable aumento en la síntesis de ácido succínico. Mediante estrategias adicionales en este contexto genético, la cepa mutante optimizada logró producir 24 veces más succinato que la cepa salvaje (Godoy 2016).

En cuanto a Cra y Crp, han sido utilizados para el diseño de bioprocesos para una enorme variedad de biocompuestos, basado en la vasta regulación que ejercen en el metabolismo central de *E. coli* y otras enterobacterias (Gorke 2008, Shimizu 2015). La manipulación de CRP ha dado lugar a distintas cepas de *Klebsiella*, eficientes para la producción de dioles a partir de una cometabolización de mezclas de sustratos carbonados (Oh 2013). Por su parte, se observó que la delección de *cra* en *E. coli* provoca un aumento en la síntesis de metabolitos fermentativos a partir del consumo simultáneo de diferentes azúcares (Yao 2013). En otro trabajo, un aumento en la síntesis de L-triptofano se atribuyó al co-metabolismo de mezclas de azúcares y el aumento de intermediarios en

la vía de los aminoácidos aromáticos, probablemente por el aumento del flujo de carbono en la glucólisis y la vía de las pentosas, en una mutante Δcra (Liu 2016). Por último, una estrategia de ingeniería de proteínas mostró que un regulador Cra modificado incrementaba la síntesis de succinato en un 30 % en *E. coli* (Zhu 2016).

En el caso de Rob, no hay estudios en los cuales se haya manipulado este regulador para modificar rutas metabólicas. La elección de este regulador global para este trabajo se basa en parte en que su ubicación en la misma región del cromosoma en que se encuentran los genes que codifican los pares reguladores ArcAB y CreBC sugirió que podrían tener alguna relación. Además, al ser un regulador poco estudiado, pero con múltiples blancos regulatorios, pensamos que podría resultar interesante analizar sus posibles efectos sobre el metabolismo.

Identificación de los efectos derivados de la manipulación de reguladores globales

Como ya dijimos, la comprensión de los mecanismos regulatorios es esencial para la manipulación y rediseño del metabolismo con el objetivo de obtener microorganismos adecuados para la producción de biocombustibles y otros biocompuestos. Sin embargo, la determinación del efecto puntual de cada regulador global no es una tarea fácil de abordar. A la extensión de los regulones de cada uno de estos reguladores debemos agregar el fenómeno de co-regulación génica: el 49% de los genes de *E. coli* son corregulados por varios factores de transcripción que incluyen la regulación por más de 1 regulador global y/o la regulación conjunta por efectores globales y específicos (Martínez-Antonio y Collado-Valdez 2003). Cabe destacar que los regulones de algunos reguladores globales se solapan parcialmente de forma antagónica (

Figura 8). Los casos más evidentes son los de Cra y Crp en el control del catabolismo de la glucosa y el ciclo de Krebs, sobre todo cuando *E. coli* crece utilizando fuentes de carbono no preferenciales, situación donde ambos están activos (Kim 2018). Por su parte, Crp y ArcA también afectan de manera opuesta el ciclo de Krebs, el primero activándolo y el segundo reprimiéndolo, cuando ambos están activos (Li 2014).

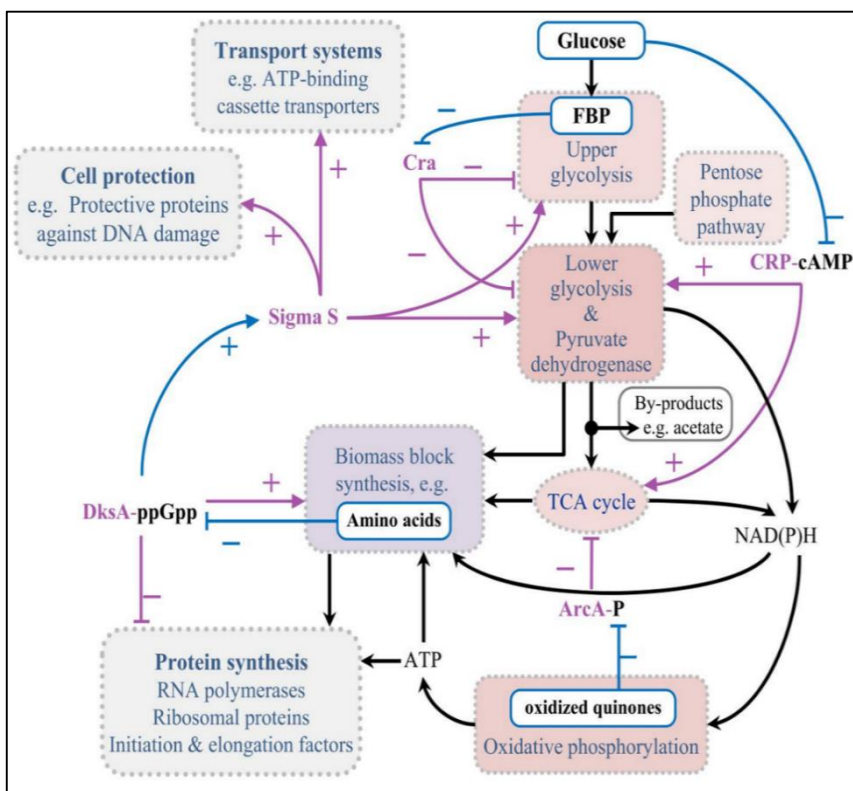


Figura 8. Co-regulación global en el metabolismo central de *E. coli*.

La glucólisis es regulada de forma antagónica por los reguladores globales Cra y CRP. Lo mismo sucede con el ciclo de Krebs, donde CRP activa la transcripción de genes que codifican para las enzimas del ciclo mientras que ArcA la reprime. Tomado de Li y col., 2014.

Aunque gran cantidad de trabajos han analizado el efecto de la manipulación de reguladores globales sobre el metabolismo y la síntesis de biocompuestos, muchos de ellos han utilizado cepas de *E. coli* cuyos genomas no están secuenciados o al menos no lo estaban al momento de analizar dichas mutaciones. Nuestros trabajos previos sobre los sistemas de 2 componentes ArcAB y CreCB se realizaron en la cepa K1060, la cual ha sido ampliamente estudiada, aunque no se conoce la secuencia de su genoma (Nikel 2009, 2010; Godoy 2016). Por otro lado, muchos trabajos han descrito la manipulación y efecto de los reguladores globales sobre la síntesis de compuestos biotecnológicos pero utilizando bacterias que llevan en su genoma mutaciones adicionales, algunas de ellas en genes involucrados en el metabolismo central. Entre ellos, se ha descrito la producción mejorada de PHB en *E. coli* LS5218 mediante la eliminación de ArcA (Scheel 2016). Sin embargo, esta cepa no está secuenciada y posee en su genoma mutaciones en genes relacionados con la degradación de ácidos grasos, que son justamente la fuente de carbono utilizada en ese trabajo. Otro ejemplo es el incremento en la síntesis de triptófano en mutantes *cra* de la cepa FB04, la cual posee deleciones en varios de los genes que regulan la síntesis de aminoácidos aromáticos (Liu 2016). Estos factores dificultan la correcta interpretación de los efectos de los reguladores globales *per se*, debido a los complejos fenotipos que pueden generar estos reguladores pleiotrópicos sobre

el metabolismo y la fisiología, que además puede variar en diferentes contextos genéticos y ambientales.

El uso de cepas no caracterizadas o con mutaciones adicionales también interfiere con la posibilidad de extrapolar los resultados obtenidos a otros organismos e identificar reguladores globales cuya manipulación tenga el potencial de generar contextos adecuados para la sobreproducción de biocompuestos. Evidencia de esto último son los efectos cepa-dependientes que se han observado con respecto al efecto de reguladores globales. Sobre la base de estudios realizados en *E. coli* MC4100, se creía que ArcA tenía que ver exclusivamente con el mantenimiento del estado redox en microaerobiosis, ya que no se observaron cambios significativos en el análisis de flujo de carbono bajo aerobiosis y anaerobiosis (Alexeeva 2003). Sin embargo, el análisis del flujo metabólico de cultivos en quimiostato de la cepa BW25113, utilizando glucosa como fuente de carbono, reveló cambios importantes en el ciclo del TCA, en la ruta de las pentosas fosfatos, y también en el complejo Piruvato deshidrogenasa, en mutantes $\Delta arcA$ y/o $\Delta arcB$ crecidas tanto en condiciones microaeróbicas (Nizam 2009) como aeróbicas (Nizam 2008). Se han observado diferencias similares al comparar los efectos de otros reguladores globales, como CreC, entre cepas de *E. coli* K1060 (Godoy 2016) y DH5 α (Avison 2001), en varias condiciones de crecimiento.

Un estudio comparativo de los efectos transcripcionales y metabólicos de la delección de *cra* en dos cepas de *E. coli*, mostraron que la eliminación de Cra tuvo profundos efectos en la expresión génica y crecimiento de la cepa JM109, mientras que no afectó significativamente a la cepa BL21. Una de las diferencias más relevantes entre las cepas fue la expresión de los genes del operón *bet*, involucrado con la tolerancia a estrés osmótico, que se veía afectada por la delección de *cra* en la cepa JM109, pero no en la cepa BL21, con respecto a las cepas salvajes en cada caso (Son 2011). Además, se observó que mientras que la cepa mutante de la JM109 rápidamente inhibía su crecimiento cuando el ácido acético se acumulaba, no hubo diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad a acético entre las cepas BL21.

El uso de contextos genéticos definidos

Esta dependencia de la cepa complica la identificación de los cambios que pueden ser atribuidos a cada regulador global, por lo que se necesitan estudios comparativos en un entorno genético uniforme para lograr una mejor comprensión de los efectos de la manipulación de los reguladores globales sobre la fisiología celular y particularmente sobre metabolismo central.

La cepa BW25113 es una de las cepas de *E. coli* más utilizadas actualmente y ha sido obtenida directamente de la cepa ancestral K-12 sin la utilización de mutágenos (Baba 2006, Grenier 2014). La misma fue utilizada para la construcción de una colección de casi 4000 mutantes de delección, la colección Keio (Baba 2006). Estas mutantes fueron obtenidas por el método de reemplazo alélico por recombinación homóloga, lo cual permitió tener delecciones de genes individuales bien definidas y no polares en un contexto genético uniforme y con un *pedigree* bien conocido (Datsenko 2000, Baba 2006). La colección Keio ha sido además re anotada (Baba 2008) y recientemente, el genoma completo de la cepa BW25113 ha sido secuenciado y publicado (Grenier 2014).

Vale la pena mencionar que uno de los modelos metabólicos de *E. coli* más recientes ha sido desarrollado en esta cepa, sirviéndose de la disponibilidad de la colección Keio y la caracterización fenotípica hecha de cada una de las mutantes en medio mínimo y rico (Baba 2006). Además, el estudio más reciente sobre la determinación de la contribución de la regulación global sobre el patrón de expresión en diferentes condiciones de cultivo, del cual hablamos más arriba, se realizó en esta cepa de *E. coli* (Kochanowski 2017).

Respuesta a estrés en *E. coli*

La respuesta general a estrés está caracterizada por numerosas alteraciones fisiológicas, incluso morfológicas, aumentando la resistencia a condiciones de estrés y, por ende, permitiendo la supervivencia de la célula. Esta respuesta es disparada bajo diferentes condiciones que comprometen la viabilidad celular como el hambreado, alta osmolaridad, cambios en la temperatura o el pH (Storz y Hengge-Aronis 2000). Estos estímulos externos devienen en la acumulación de RpoS, una subunidad (factor σ^S) de la RNA polimerasa y el regulador maestro de la respuesta a estrés. La acción de este regulador global y la comprensión de los procesos moleculares, a la luz de la regulación transcripcional global de *E. coli*, que tienen lugar en durante la fase estacionaria, han dado lugar al concepto de respuesta general a estrés.

RpoS, que al principio era considerado como el regulador global de la fase estacionaria (Lange 1991). Fue descubierto por diferentes grupos en investigaciones independientes como un gen involucrado en la resistencia UV y en el control de genes como *katE* (que codifica una catalasa) y *xthA* (Exonucleasa III). Finalmente todos hallaron que se trataba del mismo gen que se expresaba en fase estacionaria inducido por hambreado (Lange 1991). Desde entonces el número de genes regulados por el factor σ^S ha crecido exponencialmente. Mediante experimentos de chips de DNA se identificaron más de 500 genes regulados directa o indirectamente por RpoS (Patten 2004, Weber 2005). Recientemente, un análisis transcriptómico utilizando la técnica ChIP-Seq mostró que la transcripción del 23 % de todos los genes de *E. coli* era afectado por la actividad de este regulador (Wong 2017). Más interesante fue el hecho de que el regulón de RpoS parece responder a la concentración de esta proteína de manera diferencial.

La abundancia de RpoS responde a una compleja red regulatoria (Figura 9) (Battesti 2011) que incluye:

- regulación transcripcional: aunque se sabe que la contribución de este tipo de control no es dramático, diferentes reguladores, como BarA, se unen directamente a su promotor. También se ha reportado que los niveles de ppGpp pueden incrementar los niveles de RNA mensajero.
- regulación traduccional: este nivel de regulación es clave y ocurre por distintos mecanismos, entre ellos, pequeños RNA regulatorios que interactúan con el mensajero a través de la proteína Hfq estabilizándolo o impidiendo su traducción, la unión de proteínas como Hfq, CsdA, CspC y CspE y la degradación del mRNA mediante la RNasa III.

- regulación a nivel de enzima: proteínas como Crl y Rsd promueven la estabilidad del complejo RNA polimerasa-RpoS en detrimento de RNA-RpoD, lo cual estimula la expresión del regulón
- regulación postraducciona mediante el mecanismo de proteólisis mediada por RssB.

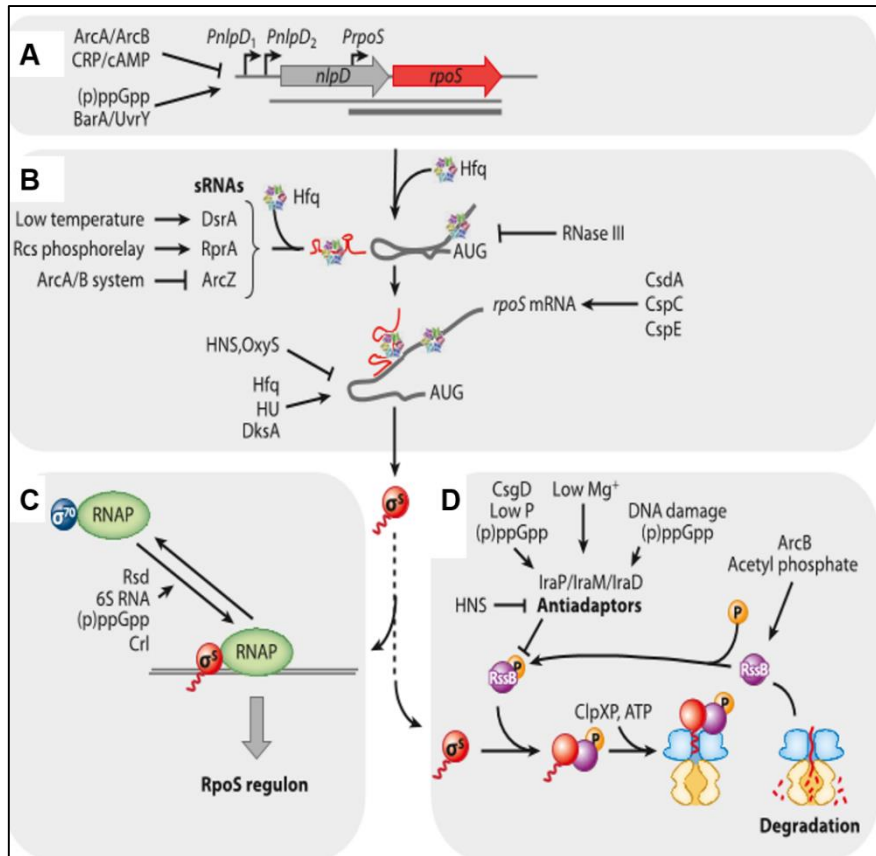


Figura 9. Niveles de regulación de RpoS en E. coli.

A: regulación transcripcional. B: regulación traduccional. C: regulación a nivel de enzima por σ^{70} . D: regulación por proteólisis enzimática. Tomado de Battesti y col., 2011.

Impacto de la regulación global en la respuesta a estrés

La regulación global juega un papel relevante sobre la modulación de los niveles de RpoS, ya que algunos de los reguladores globales del metabolismo central, anteriormente descritos, modulan la expresión génica de σ^S , como Crp, ArcAB y Lrp (Battesti 2011) mientras que el sistema ArcAB, además, extiende su influencia en la regulación traduccional y postraducciona (Mandin 2010). Debido a ello es esperable que la manipulación de reguladores globales tenga impacto sobre la capacidad de las células para responder a condiciones de estrés. Este efecto se debe tener en consideración al estudiar el fenotipo de cepas manipuladas, tanto por la caracterización de dicho fenotipo como por su potencial aplicación biotecnológica, ya que podrían afectar la capacidad de tolerar diferentes compuestos durante los bioprocesos.

De hecho, hay reportes previos que indican que los genes regulatorios globales afectan la tolerancia a diversos factores de estrés en *E. coli*. El trabajo de Shimada y col. 2011, tratando de analizar y caracterizar los posibles blancos de Cra a través del genoma, mostró que este regulador controlaría diversos factores de la respuesta a estrés como MarA, MarR, EnvY y Fur (Shimada 2011). En 2008, Okochi y col. investigaron el efecto de la delección de varios reguladores globales asociados al metabolismo de hidratos de carbono con el objetivo de investigar la capacidad de estas mutantes de tolerar la presencia de solventes orgánicos. Los resultados mostraron que la eliminación de ArcA, ArcB y Cra disminuían la capacidad de formación de colonias en placas de Petri cubiertas con hexano o una mezcla de hexano-ciclohexano. Por el contrario, la delección de *crp* causaba un aumento significativo en la tolerancia a solventes orgánicos (Okochi 2008).

Se ha reportado que ArcA controla la expresión el operon *gadE-mdtEF* en *E. coli* creciendo bajo condiciones anaeróbicas. Este operón codifica un sistema de eflujo, caracterizado como un sistema de resistencia multidroga (*mdtEF*) mientras que GadE es el regulador de la respuesta a estrés inducido por ácidos (Deng 2013).

Respuesta a estrés en bioprocesos

Solventes

El uso de microorganismos para la producción de compuestos a partir de fuentes renovables es uno de los temas más estudiados de la actualidad debido a la necesidad de encontrar alternativas al uso de derivados del petróleo. Recientemente, ha cobrado importancia el uso de biomasa o subproductos industriales como fuentes de carbono y energía. Este tipo de sustratos requieren procesamiento previo para que los microorganismos puedan utilizarlos. Este procesamiento puede generar compuestos tóxicos o inhibitorios. Además, la naturaleza de los productos sintetizados durante la fermentación también puede resultar inhibitoria para las células, lo cual va en detrimento de la productividad, el crecimiento y el desarrollo operacional de los bioprocesos (Nicolau 2010). La productividad en estos casos está limitada por el efecto tóxico que este tipo de compuestos provoca en la membrana celular desestabilizándola, el daño a biomoléculas en general y el aumento de la permeabilidad, afectando el transporte y la generación de energía, entre otros factores (Nicolau 2010). Entre estos compuestos tóxicos, los más estudiados son el EtOH en *E. coli* y *S. cerevisiae*, los hidrocarburos en *P. putida* y el butanol (ButOH) en *Clostridium acetobutylicum*. Entre las respuestas a este tipo de estrés se puede diferenciar, en *E. coli*, la respuesta general involucrando proteínas de choque térmico y respuestas específicas: la expulsión al exterior celular a través de

bombas de eflujo multidroga, el catabolismo de solventes, cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática (como el cociente cis/trans de fosfolípidos o la relación de ácidos grasos saturados/no saturados) y procesos energéticos, a través del transporte de azúcares y catabolismo de glucosa, que tienden a compensar el gasto energético que implica poner en marcha la respuesta a estrés.

Gradientes de nutrientes y oxígeno

Entre los factores más relevantes que desencadenan respuesta a estrés en bioprocesos, tanto general como específica, se encuentran la limitación de nutrientes y oxígeno, al menos localmente por la complejidad del mezclado dentro del biorreactor. Se ha reportado que la transcripción de varios genes relacionados con la respuesta a estrés se incrementa por la generación de gradientes de fuente de carbono y O_2 durante el crecimiento a altas densidades celulares (Schweder 2004). En particular, el exceso de fuentes de carbono como la glucosa desencadena el metabolismo de sobreflujo, como sucede en *E. coli* y *Saccharomyces cerevisiae*. Está reportado que en *E. coli* ocurre un aumento en la transcripción de *ackA* al principio de la etapa de alimentación utilizando glucosa, acumulando un exceso de acetato. La acumulación de ácidos resulta tóxica para las células (Russel 1992), especialmente a altas densidades celulares. El efecto nocivo de la acumulación de ácidos se debe al aumento de especies cargadas dentro de la célula como protones o aniones (Russel 1992). Otro factor es la desaparición del gradiente de H^+ a través de la membrana (Russel 1992). También es probable que ocurran daños al DNA, RNA y a la actividad enzimática (Abbott 2009). *E. coli* tiene sistemas regulatorios que responden a un entorno ácido. Algunos de ellos dependen de la presencia externa de aminoácidos como glutamato, arginina y lisina, ya que son incorporados por la célula donde son decarboxilados, reacción que consume H^+ y libera GABA al periplasma (Figura 11) (Stincone 2011). Otro mecanismo, conservado en muchas clases bacterianas, es el uso de fuerza protón motriz inversa, valiéndose de la alta concentración de H^+ en el citosol. Así las ATPsas pueden sacar H^+ al periplasma hidrolizando ATP (Richard 2003). En *Corynebacterium glutamicum*, el estrés por ácidos está relacionado con el transporte de hierro, genes de reparación del DNA y factores σ (Jakob 2007). En otras bacterias solventogénicas, como el género *Clostridium*, la disminución del pH estimula la producción de solventes a partir de ácidos carboxílicos como el butírico y acético, lo cual ayuda a detoxificar el medio (Paredes 2005).

Recientemente se ha propuesto que el estrés por ácidos es similar en parte al estrés oxidativo (Abbott 2009, Alsaker 2010), también común por los gradientes de oxígeno dentro del biorreactor. Para los organismos aeróbicos, la oxidación de los componentes de la cadena respiratoria es la fuente más importante de ERO como el anión radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los radicales hidroxilo, altamente reactivos ($\cdot OH$). Agentes físicos como la radiación UV y químicos, y agentes redox (menadiona, paraquat o plumbagina, entre otros) también pueden inducir estrés oxidativo (Cabisco 2000). Las ERO pueden inducir daño a todos los componentes celulares, como los ácidos grasos insaturados, peroxidándolos y haciendo las membranas lipídicas más rígidas, alterando sus funciones biológicas (Cabisco 2000). En el caso del DNA, las ERO pueden causar roturas en las hebras, adiciones y entrecruzamiento, lo cual impide la replicación. Con respecto a las proteínas, estas pueden sufrir oxidación de grupos $-SH$, reducción de puentes $-S-S-$, entrecruzamientos y fragmentación de péptidos (Stadtman 1992). Existen varios mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo: la regulación del metabolismo del hierro, debido a que está implicado en la generación de ROS; moléculas libres capaces de captar O_2 , como el NADPH, NADH y el glutatión; reparación del DNA y proteínas, mediante exonucleasas y enzimas que reducen enlaces disulfuro y metioninas oxidadas; y enzimas específicas, como las superóxido dismutasas y las peroxidasas (Cabisco 2000). Dos superóxido dismutasas (SOD), que convierten O_2^- a H_2O_2 y O_2 , se han descrito en *E. coli*. En esta especie, el H_2O_2 también es eliminado por dos catalasas, produciendo H_2O . Los genes de la superóxido dismutasa y catalasa de *E. coli* son miembros de dos importantes regulones del estrés oxidativo: los regulones *oxyR* y *soxRS*, así como el regulón de estrés general *rpoS* (Cabisco 2000). Además, por la transcripción de *soxS* mediada por SoxR se modula la expresión de más de 100 genes, muchos involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, incluyendo la MnSOD para la dismutación del superóxido; *nfo* (endonucleasa IV) para la reparación del DNA; y *yggX* para la protección de las proteínas hierro-azufre.

Otro tipo de estrés común, es el estrés osmótico durante el crecimiento a altas concentraciones de sustratos como la glucosa y el glicerol, condiciones típicas del crecimiento en lote en fermentador. Las células mantienen la cantidad de agua citoplasmática y la turgencia modulando la concentración de osmolitos mientras que permiten el paso del agua en función de la osmolaridad, para evitar la plasmólisis o la deshidratación (Storz y Hengge-Aronis 2000). Mientras que, microorganismos halófilos que acumulan concentraciones molares de K^+ y Cl^- en su citoplasma, excluyendo al Na^+ , en organismos que habitan nichos con salinidad moderada o de sequía ocasional, existe mecanismos más versátiles. *E. coli*, por ejemplo, responde a través de: síntesis de acuaporinas como la AqpZ, a

través del sistema EnvZ/OmpR (Calamita 1995); transporte de iones como el K^+ (Walderhaug 1992); y el mecanismo de *salt-out*, incorporando glicina, betaína o prolina del medio mediante el transportador ABC, en *B. subtilis* (Boch 1996) o el transportador de colina BetT, en *E. coli* (Lamark 1991). En ausencia de estos compuestos, la bacteria puede sintetizar de novo glicina, betaína o trehalosa, para reducir el estrés osmótico. (Elbein 2003).

En el caso particular del estrés osmótico inducido por Na^+ , *E. coli* regula de manera muy fina el gradiente de este ion (con menor concentración en el interior) por 2 bombas Na^+/H^+ NhaA y NhaB, que intercambian Na^+ o Li^+ por H^+ en base al gradiente de protones. Aunque no se conoce el efecto del Na^+ , probablemente compita con los H^+ en la generación de la fuerza protón motriz a pH altos e interfiera con el plegado de proteínas (Storz y Hengge-Aronis 2000).

Durante el crecimiento exponencial, el gen *nhaA* es activado por el regulador NhaR, cual se sabe que responde directamente a la concentración del ion Na^+ . Por otro lado, se sabe que *nhaA* también es controlado por el regulador global H-NS (Dover 1996). La regulación de la respuesta a este tipo de estrés es importante en bioprocesos en los cuales se producen ácidos, lo cual estimula la entrada de Na^+ a las células, particular por el agregado de NaOH o similares para regular el pH del proceso (Wu 2013).

Sobreproducción de proteínas recombinantes

Un claro ejemplo del estrés en bioprocesos es la sobreproducción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Esta situación desencadena una respuesta similar a la de golpe térmico (Dong 1995). Además de observarse un aumento en los niveles de RNA mensajero de varios genes de la respuesta a golpe térmico, también se vio incrementada la expresión de genes relacionados al hambreado y al daño al DNA (Jurgen 2000). Esto resultó más evidente cuando las células fueron crecidas en condiciones limitantes de fuente de carbono (Hoffman y Rinas 1997).

Estrategias para aumentar la tolerancia a solventes y biocombustibles **Evolución adaptativa en laboratorio**

La evolución adaptativa en laboratorios es una herramienta para aumentar los rendimientos y disminuir los costos de los bioprocesos (Portnoy 2011). Esta estrategia implica la transferencia serial del cultivo a diferentes medios con el objetivo de llegar a las condiciones deseadas. Esto ha sido útil para aumentar la tolerancia a diferentes bioproductos, pero también se ha utilizado para disminuir

los requerimientos nutricionales de bacterias utilizadas en bioprocesos, al transferir los cultivos desde un medio rico a uno cada vez menos complejo (Martínez 2007). En el caso de la producción de solventes como EtOH y ButOH, pasajes en concentraciones crecientes de isobutanol permitieron un aumento de hasta 100% en la tolerancia de la cepa de *E. coli* luego de 45 transferencias (Atsumi 2010). En *S. cerevisiae*, cultivos sometidos a la presencia de EtOH, lograron tolerar hasta 8 % (v/v) con rearrreglos en la composición de la pared celular (Zhao 2009).

Manipulación de transportadores de membrana: bombas de eflujo

Uno de los enfoques de la ingeniería metabólica ha sido la manipulación de la secreción de metabolitos para incrementar la producción de bioproductos tales como solventes y disminuir la susceptibilidad a los mismos. Como ya se mencionó, las bombas de eflujo son uno de los mayores mecanismos de resistencia a solventes en las bacterias Gram-negativas. Los sustratos de estas bombas pertenecen a un amplio rango de compuestos, desde hidrocarburos hasta detergentes. En *E. coli*, la bomba AcrAB-TolC se ha convertido en el modelo de estudio para la tolerancia a hidrocarburos monoterpénicos (Dunlop 2011). También se ha utilizado este sistema en experimentos de evolución para mejorar la tolerancia a 1-hexeno y n-octanol (Fisher 2014). Además, esta bomba es necesaria para la tolerancia y máxima producción de compuestos aromáticos como estireno (Mingardon 2015). La evolución dirigida de AcrB dio como resultado un aumento en la resistencia a ButOH, aunque en general AcrAB-TolC no está relacionada con el eflujo de alcoholes de cadena corta. Para estos compuestos cobran relevancia otros sistemas como los transportadores ABC. En un trabajo realizado para la producción de isopentenol en *E. coli*, la sobreexpresión de este sistema y el gen que codifica para MldB, dieron lugar a un aumento del 66% en la síntesis del alcohol. Además, el método mejoró la tolerancia a intermediarios inhibitorios de esta vía metabólica (George 2014).

Sobreexpresión de proteínas asociadas a la respuesta a estrés

La presencia de solventes como el ButOH y el EtOH disparan una respuesta a estrés en *E. coli* similar a la respuesta a golpe térmico, ya que inducen la expresión de genes como los que codifican para proteínas de golpe térmico y chaperonas como DnaK y DnaJ (Dunlop 2011). Entre las proteínas de golpe térmico, las chaperoninas son proteínas que logran encapsular proteínas y proveerles un entorno adecuado para su correcto plegado. La chaperonina de *E. coli*, GroELS está formada por 3

proteínas heptaméricas que logran plegar proteínas mal plegadas con gasto de ATP (Zíngaro 2013). En *Clostridium* la tolerancia a solventes está relacionada con la abundancia de la chaperona GroELS (Alsaker 2010). La sobreexpresión de los genes nativos *groELS* provocaron la reducción de la inhibición del crecimiento por ButOH en un 85% y un aumento de su producción en un 40% (Tomas 2003). En cepas de *Lactobacillus*, la expresión de chaperonas mejoró notablemente la tolerancia a ButOH (Desmond 2004). Varias combinaciones de chaperonas como GroE, GroELS, ClpB (la cual desagrega proteínas y también tiene función proteolítica), IbpA e IbpB (ambas pequeñas proteínas de golpe térmico) se han utilizado para aumentar la tolerancia a EtOH, ButOH, isobutanol y 1,2,4-butanetriol en *E. coli* (Zíngaro 2013).

Una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio ha estado centrada en el estudio de las fasinas o phasinas. Estas proteínas tienen un rol estructural en la formación de gránulos de polihidroxialcanoatos, un polímero de reserva de algunas bacterias como *Azotobacter* y *Pseudomonas*. Las fasinas se hallan en la superficie de los gránulos de PHA, generando una interfase entre el citoplasma y el núcleo hidrofóbico del polímero (Mezzina 2016). Se ha reportado que estas proteínas tienen además funciones regulatorias, y se ha visto que afectan el número y tamaño de los gránulos. Se estudió el efecto de PhaP, la fasina más abundante de *Azotobacter* FA8, en *E. coli* productora y no productora de PHB, y se observó que tiene efectos protectores tanto en presencia como ausencia del polímero. Este efecto se evidenció en condiciones normales de crecimiento y en condiciones de estrés, resultando en un aumento del crecimiento, la resistencia a golpe térmico y estrés oxidativo, además de disminuir drásticamente la expresión de genes asociados a la respuesta a estrés como *ibpB* (de Almeida 2011). A raíz de estas observaciones se realizaron una serie de experimentos que permitieron asociar este efecto protector de PhaP a una actividad de tipo chaperona. Experimentos in vitro revelaron que PhaP facilita el plegado y evita la agregación de la citrato sintasa bajo golpe térmico. Por otra parte, se observó de la localización intracelular de PhaP in vivo, mostrando que, se asocia a cuerpos de inclusión de proteínas agregadas y además reduce su número (Mezzina 2014), de manera similar a lo observado en presencia de GroELS. El estudio de la estructura de PhaP mostró que presenta similitud con la estructura desordenada de las chaperonas. Con todos estos datos se ha propuesto un posible mecanismo para el efecto protector de PhaP en *E. coli* (Figura 10). Más recientemente, se demostró que la sobreexpresión de *phaP* en *E. coli* aumentó la tolerancia a EtOH, PDO y ButOH, mejorando la síntesis de estos alcoholes y la formación de biomasa. Este efecto de PhaP fue, una vez más, comparable al obtenido cuando se

sobreexpresó *groELS*, reforzando la hipótesis de que el efecto observado se debe a su actividad de tipo chaperona (Mezzina 2017).

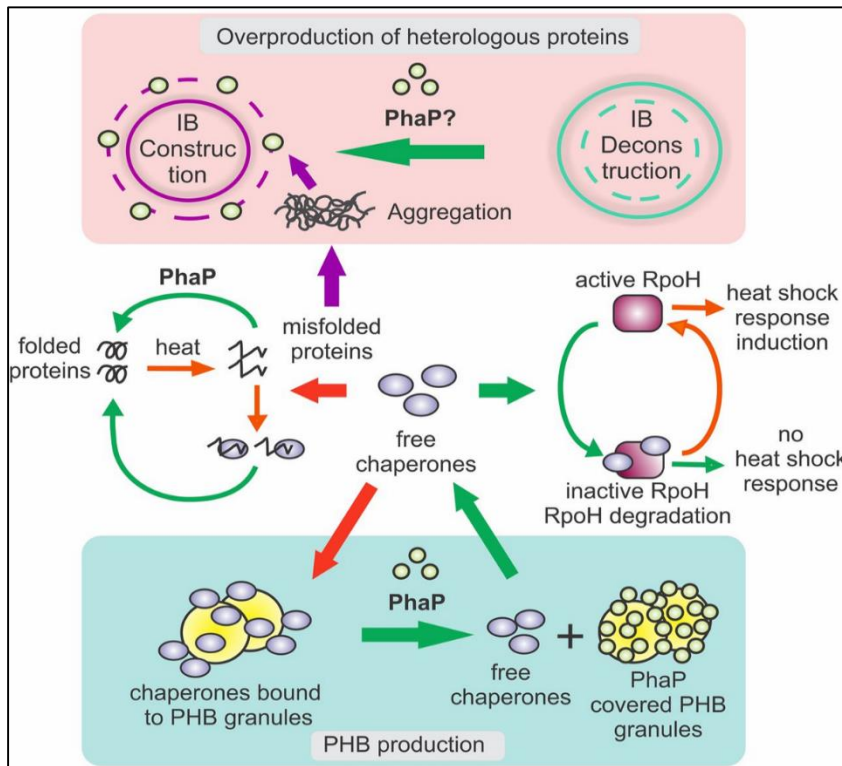


Figura 10. Efecto protector de PhaP en *E. coli*.

En base a los datos obtenidos en cepas productoras de PHB, PhaP se uniría a proteínas mal plegadas, facilitando su correcto plegado, por un lado, y por otro, esto aumentaría la disponibilidad de chaperonas libres para responder ante una situación de estrés. Además, disminuye la formación de cuerpos de inclusión cuando proteínas heterólogas son sobreproducidas en el citoplasma bacteriano. Tomado de Mezzina y Pettinari 2016.

Productos microbianos de interés industrial

El petróleo se ha convertido en mucho más que nuestra principal fuente de energía ya que se utiliza como punto de partida para la síntesis de precursores químicos empleados en la fabricación de una enorme variedad de compuestos y materiales (Jang 2012). Sin embargo, el hecho de que el petróleo sea un combustible fósil no renovable ha promovido el desarrollo de estrategias para producir energía y materiales a partir de recursos renovables y de una manera más segura para el medio ambiente (Demain 2009). Entre ellas, el uso de procesos biotecnológicos para producir energía y compuestos químicos de interés industrial a partir de fuentes renovables dando lugar al concepto de biorrefinería, donde el petróleo es reemplazado por biomasa (Cherubini 2010). La bioeconomía tendrá un rol determinante en los próximos años. Para el 2015 el biomercado ya tenía un valor de 2,4 billones de euros y actualmente la Comisión Europea apunta a lograr que sea competitiva, eficiente y de bajo uso de carbono para el 2050 (Maziere 2017).

Ácido succínico Mercado

La producción de succinato constituye una de las bioindustrias más exitosas (Maziere 2017). El departamento de energía de los EE. UU. ha ternado el succinato como uno 12 biocompuestos más prometedores (Jiang 2017).

Existen cuatro mercados o usos principales para el ácido succínico. El primero y más grande es el que lo utiliza como surfactante y/o detergente, y el segundo es como quelante iónico utilizado en la galvanoplastia para prevenir la corrosión y el rayado de los metales. El tercero es el mercado de alimentos, donde se usa como modificador del pH, saborizante o agente antimicrobiano. El cuarto mercado es el de la industria farmacéutica para la fabricación de antibióticos, aminoácidos, y vitaminas. El mercado en su totalidad genera una suma de US\$ 400 millones al año.

Importancia industrial

El succinato un ácido dicarboxílico 4 carbonos que dada su estructura lineal y saturada puede emplearse para la síntesis de 1,4-butanodiol (BDO), δ -butirolactona, tetrahidrofurano, ácido adípico, n-metilpirrolidona, esteres lineales alifáticos y polímeros biodegradables como el polibutilensuccinato (Jiang 2017).

-BDO: hay una creciente demanda de este compuesto, para 2004 ya se producían más de 400 toneladas/año. El 51% del BDO se utiliza para producir tetrahidrofurano. El resto es utilizado para producir δ -butirolactona (20%), y resinas de alta performance de tereftalato de polibutileno (20%) para las industrias electrónica y automovilística.

δ -butirolactona: las nuevas regulaciones en el uso de químicos orgánicos volátiles han abierto nuevos mercados para solventes como la N-metil-2-pirrolidona. La N-metil-2-pirrolidona ha sido recomendada como reemplazo del cloruro de metileno, debido a que es mucho menos volátil, y por lo tanto puede ser capturada y reciclada sin liberar emisiones tóxicas en la atmósfera.

-ácido adípico: es utilizado para fabricar nylon. El mercado actual en EEUU para el ácido adípico es de 900 tn con una capacidad mundial de más de 2.700 tn/año (McKinlay 2007). Debido al aumento en la demanda del benceno para obtener este ácido por métodos químicos, se utiliza la combinación de succinato y peróxido de hidrógeno; y por otro lado, la hidrogenación de succinato a BDO, el cual es posteriormente carbonilado a ácido adípico. El succinato, el ácido adípico, el BDO y el etileno pueden ser combinados para fabricar un plástico biodegradable denominado Bionolle (Maziere 2017).

-Polibutylensuccinato: tiene propiedades similares al polipropileno y polietilentereftalato. Es un poliéster cristalino de alta temperatura de fusión. El PBS se obtiene por policondensación de succinato y BDO. Además, puede incorporarse ácido adípico a la mezcla para obtener Bionolle, de mayor resistencia térmica, flexibilidad y compatible con otras fibras para la manufactura de tejidos (Maziere 2017). Además, recientemente se han desarrollado nuevos poliésteres utilizando succinato, los cuales son altamente biodegradables, de bajo punto de fusión y biocompatibles, con lo cual tienen aplicaciones médicas, como el *delivery* de drogas, aplicaciones en electrónica y también en la síntesis de poliuretanos, como plastificadores y resinas alquílicas (Maziere 2017).

Producción de succinato

EL ácido succínico puede obtenerse por catálisis química a partir de derivados del petróleo, entre ellos la hidrogenación de ácido maleico o anhídrido maleico en catalizadores de titanio en una matriz orgánica (Maziere 2017). Sin embargo, las condiciones de catálisis como las altas temperaturas y los sustratos derivados del petróleo hacen que estos métodos no sean sostenibles. Otra alternativa es la producción a través de bioprocesos, donde los microorganismos pueden sintetizar succinato a partir de fuentes de carbono renovables, incluyendo la utilización de CO₂, uno de los principales

gases de efecto invernadero (Zhu 2017). Para ser competitivos frente la síntesis química, se han realizado muchos esfuerzos para diseñar procesos y cepas con el objetivo de disminuir los costos de operación. Las vías metabólicas más utilizadas para ello son: i) la vía reductiva del ciclo de Krebs en condiciones anaeróbicas, ii) la rama oxidativa del ciclo de Krebs bajo condiciones aeróbicas y iii) la vía del glioxilato, bajo alta aireación y utilizando acetato como sustrato (Cheng 2012).

Bajo condiciones óptimas pueden obtenerse rendimientos de hasta 1 g.g⁻¹ y concentraciones mayores a 110 g.L⁻¹ (Jiang 2017). Trabajos previos muestran que con un rendimiento del 100 %, productividad de 3 g.L⁻¹.h⁻¹ y concentraciones de 250 g.L⁻¹, el costo de producción resultaría en 0,45 EUR/kg (Wilke 1999). Un aspecto importante para reducir los costos producción es la utilización de desechos o subproductos agroindustriales como el rastrojo de maíz, tallo de maíz, bagazo de caña de azúcar y glicerol, entre otros, en los procesos de fermentación (Jiang 2017).

Productores naturales

El succinato es un ácido carboxílico intermediario del ciclo de Krebs y puede ser acumulado como producto final durante la fermentación bajo condiciones anaeróbicas por diferentes tipos de microorganismos, entre ellos, *Actinobacillus succinogenes*, *Mannheimia succiniproducens*, *Anaerobiospirillum succiniproducens*, *Corynebacterium crenatum* e inclusive *E. coli* (Jiang 2017).

A. succinogenes es uno de los productores más prometedores ya que, por un lado, crece en presencia de altas concentraciones de CO₂ y produce altas concentraciones de succinato, pero, además, puede utilizar una amplia gama de fuentes de carbono, como xilosa, celobiosa, bagazo de caña y marlo de maíz, por mencionar algunos (Jiang 2017).

M. succiniproducens es otro organismo muy estudiado, una bacteria Gram-negativa que utiliza CO₂ para crecer (es capnófila) fijándolo para formar succinato y utilizando como sustratos, PEP o piruvato (Figura 11). Cultivos en lote anaeróbicos de esta bacteria crecida en suero de licor de maíz fermentado permitieron alcanzar un rendimiento de 71 % y 1,18 g.L⁻¹.h⁻¹ (Lee 2003).

Anaerobiospirillum succiniciproducens puede producir altas concentraciones de succinato a partir de glucosa. En fermentaciones utilizando un biorreactor integrado con una membrana para electrodialisis, Meynial-Salles y col. lograron obtener 83 g.L⁻¹ de succinato con un rendimiento de 1,35 mol.mol⁻¹ y una productividad de 10 g.L⁻¹.h⁻¹ (Meynial-Salles 2008). Por su parte, *Corynebacterium crenatum* logró producir 43,6 g.L⁻¹ de succinato a partir de salvado de trigo en cultivos en medio mineral y anaerobiosis (Chen 2013).

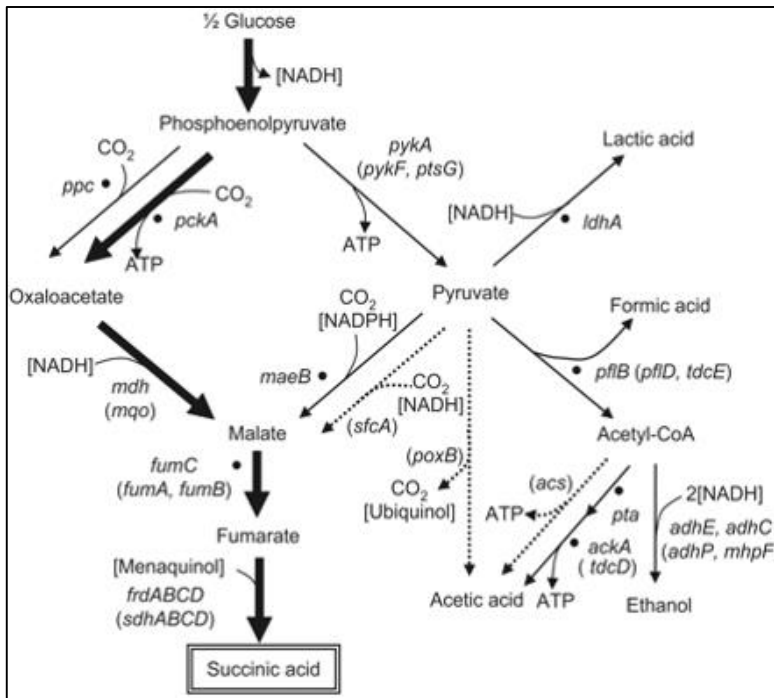


Figura 11. **Síntesis de succinato en *M. succiniciproducens*.**

Las flechas gruesas representan el principal camino metabólico para la producción del ácido. Las flechas punteadas y los genes entre paréntesis corresponden a vías de *E. coli*. Tomado de Lee et al 2006.

Producción de succinato en organismos modificados genéticamente

Aunque los productores naturales alcanzan altas concentraciones de succinato, muchas veces requieren medios de cultivos y nutrientes que hacen inviables los procesos de síntesis. Además, no son fáciles de manipular para optimizar los procesos. Por esto, una estrategia común es la modificación genética de organismos modelos como *E. coli* y *S. cerevisiae*. En *E. coli* existen 3 vías a través de las cuales se puede sintetizar el succinato: la rama i) oxidativa o ii) reductiva del TCA y iii) la vía del glioxilato. Bajo condiciones anaeróbicas, la vía reductiva del TCA es el principal camino metabólico para la formación de succinato. El PEP puede ser convertido a OAA a través de las enzimas carboxilantes y luego el OAA da lugar a la formación de succinato a través de la actividad de la malato deshidrogenasa, fumarasa y fumarato reductasa. La generación de succinato demanda 2 moles de NADH, sin embargo 1 mol de glucosa puede generar solo 2 moles de NADH durante la glucólisis y 1 hacia la formación de succinato, por lo tanto la disponibilidad de NADH es limitante (Zhu 2014). La vía del glioxilato convierte acetil-CoA y OAA a succinato y malato, generando 1 mol de succinato con 1,25 moles de NADH. Utilizando estas 2 vías simultáneamente, el rendimiento máximo teórico es 1,71 mol de succinato.mol⁻¹ de glucosa. En cuanto a la vía oxidativa del TCA, el rendimiento máximo teórico de succinato es 1 mol.mol⁻¹ de glucosa (Zhu 2017).

Eliminación de vías competitivas

Durante la fermentación en *E. coli*, la mayoría del PEP es utilizado para la síntesis de formiato, acetato y lactato, lo cual impide la acumulación de succinato debido a la limitación de NADH. La delección de *sdhAB*, *poxB*, *ackA-pta*, *iclR* y *ptsG* permitió obtener casi 60 g.L⁻¹ de succinato bajo condiciones aeróbicas en fermentaciones en lote alimentado de *E. coli* HL2769k (Lin 2005), mientras que cultivos en lote bajo condiciones anaeróbicas de mutantes *ldhA*, *adhE*, *ackA*, *focA-pflB*, *mgsA*, *poxB* de *E. coli*, que fueron sometidas a selección basada en el crecimiento en medio mineral, permitieron obtener un rendimiento de 1,2 moles por mol de glucosa (Zhang 2009). *M. succiniproducens* LPK7, una cepa mutante para los genes *ldhA*, *pflB*, *pta*, y *ackA* produjo 52,4 g.L⁻¹ de succinato con una productividad de 1,8 g.L⁻¹.h⁻¹ en cultivos en lote alimentado, lo cual es prometedor para el desarrollo de una estrategia industrial (Lee 2006).

Mejora de las vías de síntesis de succinato

El PEP generado en la glucólisis es un nodo clave en la síntesis de succinato. Las vías principales desde el PEP lo convierten en OAA mediante la fijación de CO₂, lo cual da lugar a los compuestos de 4 carbonos. Hay 5 enzimas de fijación de CO₂: la PEP carboxilasa (Ppc), Piruvato carboxiquinasa (Pck), Piruvato carboxilasa (Pyc) y las 2 enzimas málicas MaeA y MaeB. Ppc es la enzima más activa en *E. coli* y tiene una afinidad mayor por su sustrato que la Pck. Pck produce energía debido a la generación de NADH, pero su expresión es inhibida por glucosa y está activa solo durante la gluconeogénesis, en presencia de HCO₃⁻ y en ausencia de Ppc (Jiang 2017).

La sobreexpresión de *ppc* fue utilizada para aumentar la producción de succinato de 3 a 11 g.L⁻¹ en *E. coli* (Millard 1996), mientras que en una cepa de *E. coli* mutada en los genes *ldhA*, *pflB* y *ptsG*, la sobreexpresión del gen *ppc* de cianobacterias condujo a la producción de 36,55 g.L⁻¹ de succinato con una productividad de 0,83 % a partir de licor de maíz en cultivos anaeróbicos en frasco agitado (Wang 2009). Por otro lado, la sobreexpresión de los genes *pck* en una cepa mutante para *ppc* mejoró la producción energética favoreciendo la síntesis de succinato (Zhang 2009). En 2008, Liu y col. delecionaron *ldh* y sobreexpresaron el gen *pyc* (Piruvato carboxilasa) en *C. glutamicum* y obtuvieron una concentración de 146 g.L⁻¹ con una productividad de 0,92 g.g⁻¹. Por otro lado, en *S. cerevisiae*, experimentos de ingeniería metabólica aplicada al ciclo de Krebs y la vía del glioxilato permitió la obtención de un rendimiento de 1,71 mol de succinato.mol glucosa⁻¹ (Li 2013a).

Sumado a lo descrito más arriba, otro método que ha resultado relativamente eficiente para el aumento de la síntesis de succinato es el suministro de CO₂ en combinación con las enzimas carboxilantes (Yu 2016), ya que éste puede ser un factor limitante debido al coeficiente de transferencia de masa en biorreactor. El sustrato de las enzimas carboxilantes es el anión HCO₃⁻, con lo cual el CO₂ suministrado debe difundir por la membrana y convertirse a su forma aniónica dentro de la célula. Otro problema es que la membrana es poco permeable al anión, aunque el uso de transportadores específicos de cianobacterias puede disminuir esta limitante.

Mejora en los sistemas de transporte de fuentes de carbono

El sistema PTS, como ya mencionamos, consume 1 mol de PEP por cada mol de glucosa. Por lo tanto, la inactivación del PTS aumenta la disponibilidad de este precursor para sintetizar succinato, pero disminuye la eficiencia de la utilización de azúcares.

Liu y col. 2012 construyeron promotores artificiales para los genes *galP* y *glk* en una mutante de *E. coli* PTS (-), y mejoraron la tasa de consumo de la glucosa 10 veces comparado con la mutante PTS (-) mediante la modulación de la expresión del sistema. La sobreexpresión del gen *pck* de *B. subtilis* sumado a la delección de *pflB*, *ppc* y *ldhA*, le permitió a la bacteria crecer utilizando xilosa (la cual no utiliza PTS) y suplir la deficiencia de ATP (Liu 2012). Al crecer la cepa en anaerobiosis a partir de un hidrolizado de tallo de maíz, obtuvieron 11,13 g.L⁻¹ de succinato con una productividad de 1,02 g.g⁻¹. Una estrategia novedosa es la modificación de proteínas de membrana en *E. coli* con el objetivo de permitir la utilización de sustratos no nativos. La fusión de CscA con el dominio de anclaje de la porina OmpC de *E. coli*, permitió la producción de 36,3 g.L⁻¹ de succinato a partir de melazas de caña en la cepa de *E. coli* AFP111 (Ma 2014).

Optimización de cofactores

La disponibilidad de poder reductor es clave en la síntesis de succinato. La vía de las pentosas fosfato tiene un papel vital en la generación de NADPH, catalizada por los productos de *zwf* y *gnd*. La coexpresión de estos genes junto a otros genes como *pgl*, *tktA* y *talB*, incrementaron significativamente la relación NADH/NAD⁺ en *C. glutamicum*. Esta estrategia, sumada a la sobreexpresión de *pck* de *A. succinogenes* y la delección de vías competitivas, llevaron a un aumento en el rendimiento desde 0,66 a 1,01 g.g⁻¹ utilizando glucosa (Meng 2016). Otra estrategia efectiva ha sido el uso de la Formiato deshidrogenasa (Fdh) de *Candida boidinii* (Berrio-Rivera 2002b). Esta

enzima oxida formiato a CO_2 y simultáneamente regenera NADH. La coexpresión de *fdh* junto a *pyc* de *L. lactis* en *E. coli*, aumentó la productividad de succinato de 1 a 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Balzer 2013). Una estrategia similar se utilizó en *E. coli* BA002, expresando *pncB*, que codifica una enzima involucrada en la síntesis de NADH, incrementando la producción de succinato de 1,57 a 14,08 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Ma 2013). EL suministro de otros dadores de electrones, como el H_2 , también incrementan los niveles de succinato. El reciclado de gases generados en las fermentaciones acetobutílicas (cuyo contenido es 60% CO_2 y 30% H_2) incrementó la producción de succinato hasta 65 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (He 2016). Por otro lado, el diseño de cultivos utilizando sustratos que alteran la relación NADH/NAD, como sorbitol, gluconato o glicerol también tiene un impacto positivo en la síntesis de succinato (Jiang 2017).

Estrategias alternativas

Además de la manipulación genética sistemática que conlleva el riesgo de un desbalance de poder reductor o en niveles de enzimas, lo cual puede producir la inhibición del crecimiento (Jantama 2008, Portnoy 2010), también se han intentado otros enfoques para incrementar la producción de succinato, como los experimentos de evolución metabólica. Este método permite la obtención de fenotipos estables, adaptados a una condición ambiental determinada. Por ejemplo, Jantama y col. 2008 sometieron a evolución a una cepa mutante de *E. coli* por 2000 generaciones en medio mínimo, luego de las cuales el fenotipo se estabilizó y logró un aumento de 1200% en la síntesis de succinato comparado con la cepa original.

El estudio de la regulación global se ha convertido en los últimos años en una herramienta importante como alternativa a la ingeniería genética tradicional, y es la idea central de esta tesis. Este enfoque modifica y redirige los flujos de carbono y poder reductor y resuelve alguna de las limitaciones de la ingeniería metabólica. Esta estrategia se ha utilizado en algunos trabajos para aumentar la síntesis de succinato. Por ejemplo, sobreexpresando el RNA no codificante de efecto pleiotrópico RyhB en *E. coli* se inhibió la expresión de *sdhCDAB*, lo cual aumentó la concentración de succinato más de 6 veces (Kang 2012). En nuestro laboratorio, recientemente se optimizó, mediante una estrategia combinada (Figura 12), la síntesis de succinato en *E. coli* K1060. Para ello se partió de mutantes $\Delta creC$, que exhibieron un aumento significativo en este ácido en cultivos en medio mínimo y microaerobiosis. Luego de sobreexpresar los genes *ppc* y *fdh1* de *C. boidinii* en esta mutante, se logró un aumento total de 24 veces la concentración de succinato, comparado con la cepa salvaje de *E. coli* K1060 (Godoy 2016). En otro trabajo reciente, Zhu y col. modificaron el

regulador Cra para aumentar de su afinidad por FBP, lo cual permitió un incremento en la síntesis de succinato, alcanzando 92,7 g.L⁻¹ en cultivos en biorreactor (Zhu 2016).

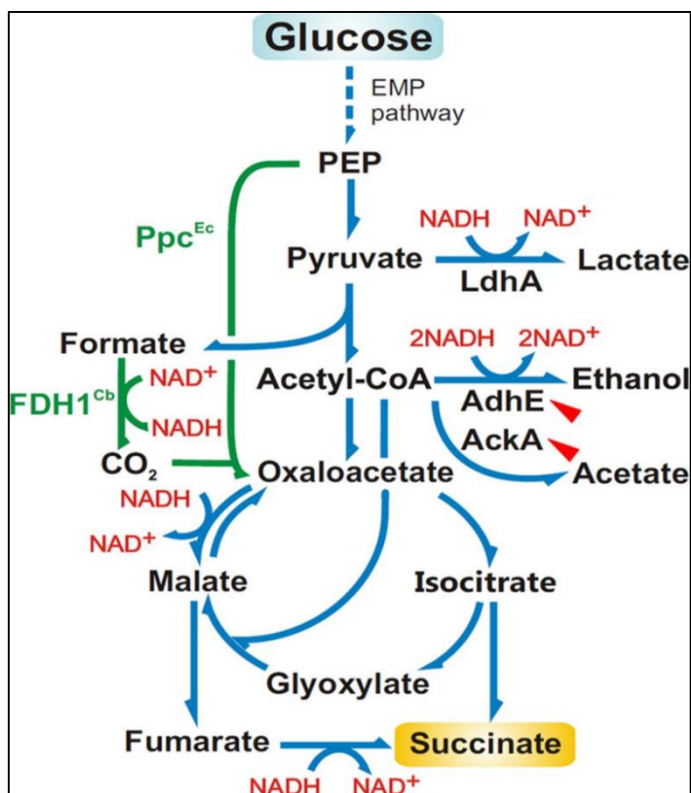


Figura 12. Síntesis de succinato en *E. coli* sobreexpresando la enzima carboxilante Ppc y la enzima anaplerótica Fdh1.

Esta estrategia utilizada en mutantes de delección $\Delta creC$ llevó a un aumento significativo de la síntesis de succinato en condiciones de anaerobiosis.

1,3-propanodiol

El PDO es un precursor químico de alto valor adecuado para la producción de una gama diversa de compuestos incluyendo poliésteres, poliuretanos y un polímero de nueva generación llamado politrimetilentereftalato (PTT), de alta elasticidad, biodegradabilidad y resistencia química. Tradicionalmente el PDO se ha obtenido a partir de recursos no renovables, en procesos de alto requerimiento energético y no ecológicamente sustentables. Por lo tanto, gran parte de la producción actual está basada en procesos de fermentación bacteriana, a partir de recursos renovables como glucosa o glicerol.

En la actualidad la firma Dupont-Tate and Lyle produce este compuesto industrialmente utilizando microorganismos y glucosa obtenida por hidrólisis de maíz, y lo comercializa bajo los nombres de Susterra y Zemea. Según los datos publicados por la empresa en su página de internet (http://duponttateandlyle.com/our_process), el PDO obtenido mediante este proceso produce 56%

menos emisiones de gases de efecto invernadero y consume un 42% menos de energía no renovable cuando se compara con la obtención a partir de derivados del petróleo.

Importancia industrial

El PDO es incoloro, viscoso y altamente miscible en agua y EtOH. Puede ser utilizado como monómero para la síntesis de muchos bioplásticos, entre ellos el PTT, un poliéster que puede ser utilizado como lubricante tipo poliglicol y como fibras para la manufacturación de textiles. Esto le confiere características únicas y, además, puede ser policondensado para la fabricación de *composites*, adhesivos, laminados, revestimientos, poliésteres alifáticos, barnices y anticongelantes (Yang 2018). También sirve de bloque de construcción para compuestos heterocíclicos como el indol y las quinolinas (Saxena 2009). Para 2007 el mercado de PDO era de alrededor 50000 ton/año (Krause 2008) y rápidamente se incrementó a 125000 ton/año para 2013. Puede obtenerse vía catálisis química de 2 maneras: la hidroformilación del óxido de etileno y la hidratación de la acroleína. Sin embargo, estos procesos cuentan con varias desventajas, entre ellas, el consumo energético, el costo de los catalizadores y la liberación de intermediarios tóxicos. Por estas razones, los métodos biológicos ofrecen una muy buena alternativa. Casi el 90 % del PDO comercial está basado en la producción biotecnológica, encabezando la lista de empresas que lo manufacturan, DuPont (Harmsen y Hackmann 2014).

Actualmente, la bioconversión del PDO puede obtenerse de 2 maneras. En 2004, DuPont y Genecor construyeron una planta en Londres para la producción de PDO a partir de glucosa (Nakamura 2003), la misma fue comisionada en 2006. Por otro lado, es posible obtener PDO a partir de glicerol utilizando productores naturales o microorganismos modificados, esto atrajo especial atención desde 1980, cuando se incrementó la producción de biodiesel, donde el glicerol es un subproducto (Sun 2018). Muy recientemente 2 compañías: METabolic Explorer (Francia) y SK Chemicals (Corea del Sur) anunciaron un acuerdo para la producción de este compuesto a partir de glicerol, pensando el mercado europeo y asiático para satisfacer la demanda mundial. Una planta con una capacidad de producción de 20000 toneladas por año está funcionando actualmente en Jiangsu, China (Sun 2018).

Actualmente se estima que el costo de la producción de PDO es alto, la mayor parte se debe a los costos del glicerol (U\$S 400/tonelada), que se utiliza como sustrato, y los costos de la purificación luego de la fermentación, estimados en U\$S 2000/tonelada. El precio actual de mercado ronda los U\$S 4000/tonelada para el PDO, con lo cual se están haciendo numerosos esfuerzos para obtener

mayores cantidades y aumentar la tasa de conversión de los bioprocesos para extender la industrialización de este compuesto (Yang 2018). El desarrollo de biorrefinerías, donde se producen simultáneamente varios tipos de compuesto a partir de la fermentación es una estrategia enfocada a reducir el costo de producción del PDO y otros dioles como el 1,4-butanodiol y 1,2-propanediol (Sabra 2015).

Usos del PDO para la producción de polímeros industriales: Politrimetilentereftalato y poliuretanos

El PTT es obtenido a partir de la condensación de PDO y ácido tereftálico. Tradicionalmente, en lugar de PDO se ha utilizado polietileno para obtener el plástico comercial PET, el cual no es biodegradable. El PTT tiene propiedades muy similares al PET y comenzó a ser comercializado en 2000, sobre todo para la producción de fibras textiles y alfombras (Harmsen y Hackmann 2013). Es utilizado para la fabricación de ropa, lencería, alfombras y en la industria automovilística. Es uno de los biopolímeros más importantes de los desarrollados por DuPont, fabricado a partir del PDO producido por la misma empresa bajo el nombre de Susterra. La compañía francesa Metabolic Explorer también lo comercializa con una capacidad de 8000 ton/año, que puede expandirse a 50000. Shell también comercializa PTT como Corterra desde 1990 cuando el proceso de obtención fue optimizado y la patente se remonta a 1941. A diferencia de empresas anteriores, lo hace a partir de derivados del petróleo (Harmsen y Hackmann 2013).

Los poliuretanos son polímeros con numerosas aplicaciones y se obtienen por la condensación de polioles con di-isocianatos. Se utilizan en la fabricación de espumas de variadas densidades para revestimientos, adhesivos y selladores. Estos pueden obtenerse también empleando biopolímeros, constituyendo un volumen global de 28000 ton/año. En particular, los poliuretanos obtenidos en base al PDO tienen propiedades excelentes para aplicaciones textiles, revestimientos y plásticos de ingeniería. La compañía española Merquinsa produce poliuretanos utilizando Susterra de DuPont, los cuales están compuesto por 60% de materiales renovables, con un volumen de producción de 10000 ton/año (Harmsen y Hackmann 2013).

Biosíntesis de 1,3-propanodiol

Entre los productores naturales, el PDO sólo puede ser obtenido a partir de glicerol. Algunos microorganismos son capaces de degradar glicerol como única fuente de carbono en condiciones

anaeróbicas. En estos, el glicerol atraviesa la membrana por difusión simple o facilitada, esta última llevada a cabo por el transportador GlpF. Este facilitador selectivo deja pasar moléculas pequeñas, neutras y lineales. Una vez en el citoplasma puede ser metabolizado por 2 tipos de vías paralelas: oxidativas o reductivas (Figura 17). En las oxidativas, el glicerol es oxidado a dihidroxiacetona (DHA) por la enzima Gdh, la cual es dependiente de NADH, y luego la DHA es fosforilada a dihidroxiacetona fosfato por la enzima DhaK gastando ATP (Yang 2018). La dihidroxiacetona fosfato se transforma luego en piruvato y de allí, es precursor metabólico de ácidos orgánicos, EtOH, 2,3-butanodiol, CO₂ y H₂. La rama reductiva implica la reducción de glicerol a 3-hidroxi propionaldehído, catalizado por la glicerol deshidratasa (GDHt codificada por *dhaB*), dependiente de la vitamina B12. Luego la acción de la PDO óxidorreductasa (PDOR codificada por *dhaT*) convierte el hidroxipropionaldehído en PDO (Figura 13). Esta reacción tiene un rendimiento de 0,875 mol.mol⁻¹ cuando todo el acetilCoA entra al ciclo de Krebs y no se forma acetato (Sardari 2013), pero desciende a 0,72 mol.mol⁻¹ cuando el ácido acético es sintetizado (Marvoet 2011).

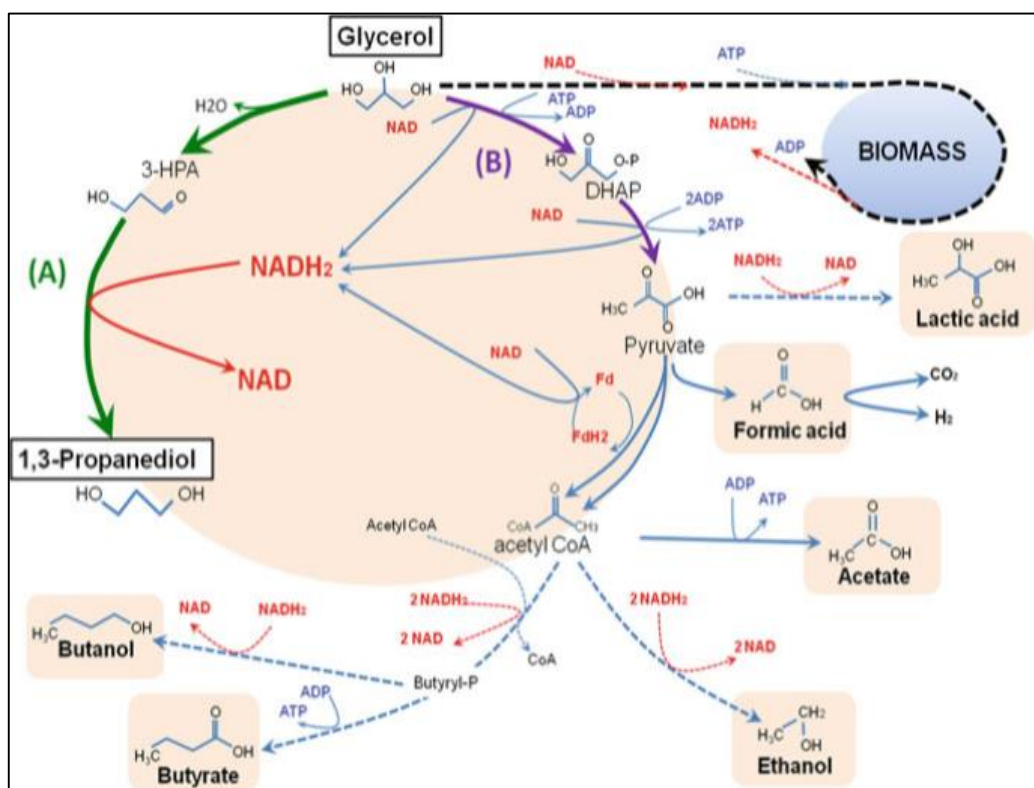


Figura 13. **Metabolismo del glicerol en *K. pneumoniae*.**

Esta bacteria es una productora natural de PDO mediante el metabolismo reductor del glicerol (A). En la rama oxidativa (B) puede sintetizar etanol, ácidos orgánicos y 2,3-butanodiol. Tomado de Sabra y col., 2015.

Algunos de los organismos productores naturales de PDO son: *Klebsiella* (*K. pneumoniae* y *K. oxytoca*), *Clostridium* (*C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. bifermentans*, *C. saccharobutylicum* y *C. diolis*), *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. amalonaticus* y *C. werkmanii*), *Lactobacilli* (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. diolivorans*, *L. panis* y *L. reuteri*) y *Enterobacter* (*E. agglomerans*) (Sun 2018). También se ha observado en *Hafnia alvei*, *Trichococcus* y *Halanaerobium saccharolyticum* subsp. *saccharolyticum*. Entre ellos, *Klebsiella* y *Clostridium* son los más estudiados. Mientras que *Clostridium* es anaeróbica, *Klebsiella* puede utilizar glicerol bajo diferentes condiciones de disponibilidad de O₂, pero al ser patógena, restringe su uso en la industria. *K. pneumoniae* DSM4799 alcanzó los 80 g.L⁻¹ de PDO en cultivos en lote alimentado a partir de glicerol crudo (Jun 2010). Cultivos en lote alimentado de *C. butyricum* AKR 102a alcanzaron los 93,7 g.L⁻¹ con una productividad de 3,3 g.L⁻¹.h⁻¹ (Wilkens 2012).

Ingeniería genética para la producción de PDO

La síntesis de PDO a partir de glicerol conlleva varias limitaciones: la toxicidad del hidropropionadehído; la susceptibilidad de las enzimas glicerol deshidratasa y PDO óxidoreductasa; y el efecto inhibitorio del PDO sobre el crecimiento. Esto último fue estudiado en cepas *C. butylicum*, donde 80 g.L⁻¹ de PDO en el medio resultaba letal para la bacteria debido a los efectos sobre la membrana celular, similares a los del EtOH (Colin 2000). Además, la formación de compuestos que compiten con la síntesis de PDO y el balance redox también son limitantes. Los intentos de eliminar las vías competitivas también afectan el balance de cofactores, el cual debe ser mantenido. Esto constituye uno de los mayores desafíos en la síntesis de PDO. Con el objetivo de superar estas limitantes varias estrategias de ingeniería genética se han desarrollado tanto en los microorganismos productores nativos como los que son capaces de sintetizar PDO de forma heteróloga.

Inactivación génica

Una de las estrategias más utilizadas es la eliminación de genes que intervienen en vías que compiten con la síntesis de PDO. La eliminación de la enzima AldH en *K. pneumoniae* YMU2 mejoró la síntesis de PDO, llegando a 70,5 g.L⁻¹ con una productividad 1 g.L⁻¹.h⁻¹, mucho más alto que los parámetros obtenidos en la cepa parental (Zhang 2006).

En *Klebsiella*, el lactato y el BDO son uno de los principales metabolitos competidores del PDO, desviando el flujo de carbono y consumiendo poder reductor (Yang 2018). El BDO complica la purificación de PDO, por la similitud en los puntos de ebullición con el PDO, y aumenta los costos de

producción. Horng y col. inactivaron los genes *dhaD* y *dhaK*, involucrados en la conversión de DHA en *K. pneumoniae*, lo cual dio lugar a un aumento de más del doble en la síntesis de PDO, comparada con la cepa salvaje y no se detectó la formación de lactato y BDO (Horng 2010). Durgapal y col. construyeron una cepa Δ *ldhA* de *K. pneumoniae* J2B y fue comparada bajo distintas condiciones de crecimiento con la cepa control. Aunque produjo 58 g.L⁻¹ de PDO y aunque no se detectó lactato, aumentó considerablemente la concentración de BDO (Durgapal 2014). En un estudio subsiguiente, delecionaron en esta cepa el operon *bud*, responsable de la síntesis de BDO, y como resultado obtuvieron una disminución de PDO. Debe tenerse en cuenta que la eliminación de vías competitivas disminuye la formación de biomasa, lo cual a su vez afecta la reducción del glicerol y, por otro lado, la disminución de productos secundarios va en detrimento de la generación de poder reductor (Kaur 2015). Cuando los genes *adhE*, *dhaD* y *ldhA* fueron delecionados en *C. wermanii*, se obtuvo el máximo rendimiento teórico de 1 mol.mol⁻¹ utilizando glicerol como fuente de carbono, en comparación con 0,63 mol.mol⁻¹ de la cepa control. En este trabajo, la concentración de PDO llegó a 107 mM en cultivos anaeróbicos utilizando glucosa y glicerol (Marvoet 2014).

Sobreexpresión de genes

La sobreexpresión de una alcohol deshidrogenasa dependiente de NADPH en *K. pneumoniae* ACCC10082 causó un aumento del 10% tanto en la concentración como en el rendimiento de PDO, en fermentaciones en lote alimentado (Chen 2010).

Oh y col. obtuvieron una mutante que no era capaz de producir compuestos secundarios mediante la eliminación del metabolismo oxidativo del glicerol y en este contexto sobreexpresaron los genes *dhaB* y *dhaT*. El efecto de DhaT aumentó significativamente el rendimiento y se logró una concentración de PDO eficiente a partir de glicerol tanto crudo como purificado, sin la formación de otros metabolitos (Oh 2013). La isoenzima de la PDO óxidoreductasa codificada por *yqhD* de *E. coli*, fue sobreexpresada en *K. pneumoniae* causando un notable aumento del 125% en la concentración de PDO, llegando a 67,8 g.L⁻¹ (Zhu 2009). Además, la actividad óxido reductasa resultó ser 10 veces mayor y la concentración del intermediario tóxico hidroxipropionaldehído se redujo en un 22,4 %.

Manipulación de cofactores

Al igual que lo visto para la optimización de succinato, el efecto de la enzima Fdh fue investigado en *K. oxytoca*, con el objetivo de analizar la redirección del metabolismo y el nivel intracelular de

equivalentes de reducción. La relación NADH/NAD⁺ resultó inalterada pero la concentración de ambas moléculas por separado se incrementó, causando un aumento del flujo hacia PDO, EtOH y lactato (Zhang 2009). En otro trabajo, se logró aumentar el nivel de cofactores sobreproduciendo las enzimas glicerol deshidrogenasa y dihidroxiacetona quinasa de *E. coli* en *C. beijerinckii*. Usando esta cepa en fermentaciones a partir de licor de maíz en lote alimentado en reactor en lecho fibroso se alcanzó 26,1 g.L⁻¹ de PDO con una productividad de 0,99 g.L⁻¹.h⁻¹ y un rendimiento del 55 % (Wischral 2016).

Uso de mutagénesis no dirigida para mejorar la obtención de PDO

Uno de los métodos clásicos para el desarrollo de cepas es la mutación inducida por mutágenos. La exposición de las células a ciertos factores físicos o químicos, como la radiación UV, el cloruro de Litio o la nitrosoguanidina, aumenta la tasa de mutaciones espontáneas. Aunque las mutaciones originadas son al azar, este método es exhaustivamente utilizado para obtener cepas productoras de uso industrial y alterar vías metabólicas (Sun 2018). Por ejemplo, a partir de protoplastos de una cepa de *K. pneumoniae* productora de PDO que fueron sometidos a UV_{254 nm}, se aislaron 3 cepas capaces de producir altas concentraciones de PDO. Fermentaciones en lote alimentado de las mismas permitieron obtener hasta un 35% más de PDO comparado con el control, de 58 a 75 g.L⁻¹ (Lu 2011). Du y col. obtuvieron mutantes de *K. pneumoniae* mediante una combinación de UV y LiCl. Luego de una selección por potencial de óxido-reducción de las cepas, hallaron una mutante capaz de producir casi 70 g.L⁻¹, lo que representaba un 63 % más que la cepa parental (Du 2007). En particular, un método novedoso llamado descarga de plasma en barrera dieléctrica ha sido diseñado para mejorar la producción de PDO en *K. pneumoniae*, incrementando la tasa de mutaciones por la generación de UV, partículas cargadas, radicales y alto campo eléctrico (Dong 2010). Dong y col. mostraron que células tratadas con esta tecnología eran capaces de producir un 59 % más de PDO (con una concentración final de 77 g.L⁻¹) en cultivos en lote alimentado con una productividad 55 % mayor, comparado con la cepa salvaje (Dong 2010).

Estrategia de fermentación en biorreactor para incrementar la síntesis de PDO

Diferentes estrategias se han diseñado para la producción de PDO en biorreactor, sobre todo en cultivos en lote o lote alimentado y condiciones anaeróbicas o microaeróbicas. Debe tenerse en cuenta que la estrategia de fermentación, como lote alimentado, cultivo continuo o fermentaciones

de varios estadios, influye de forma determinante en el rendimiento y la productividad. El 50% del costo de una fermentación para obtener PDO a partir de biomasa deriva del sustrato utilizado. Por lo tanto, en procesos de escala industrial es muy atractivo el uso de subproductos industriales de bajo costo como el glicerol, como ya se ha mencionado, pero también la glucosa y el almidón. Actualmente, se han desarrollado cepas capaces de fermentar carbohidratos directamente a PDO y también cultivos de 2 etapas para utilizar azúcares como fuente de carbono. Nakamura y col. lograron modificar *E. coli* para que sintetice PDO a partir de D-glucosa de forma directa, llegando a producir 135 g. L⁻¹ en fermentaciones en lote alimentado. La productividad resultó ser de 3,5 g.L⁻¹.h⁻¹, con un rendimiento de 51 % (Nakamura 2003). Recientemente, se reportó una nueva vía de conversión de glucosa en PDO utilizando ingeniería de proteínas (Chen 2015). A diferencia del proceso patentado por DuPont, la síntesis de PDO involucra la vía de la homoserina con 3 pasos enzimáticos adicionales: i) la deaminación de la homoserina a 4-hidroxi-2-cetobutirato, ii) la decarboxilación del 4-hidroxi-2-cetobutirato a hidroxipropionadehído y iii) la reducción de hidroxipropionadehído a PDO.

Uso de sustratos múltiples

Comparado al uso de glicerol como única fuente de carbono, la co-utilización de glicerol y una fuente económica como la glucosa, sacarosa, maltosa, inclusive xilosa e hidrolizados hemicelulósicos, proveen equivalentes de reducción y ATP, tanto para síntesis de PDO como para el crecimiento y la producción de biomasa.

Fermentaciones de *C. butyricum* DSM5431 a partir de glucosa y glicerol, indicaron que la primera era utilizada para producir energía mientras que el glicerol generaba poder reductor (Abbad-Andaloussi 1998). Análisis estequiométricos de la co-fermentación de glucosa y glicerol en *K. pneumoniae*, revelaron que el 100% del glicerol podía convertirse en PDO en una relación 0,32 mol glucosa.mol glicerol⁻¹, bajo condiciones microaeróbicas (Xiu 2007).

El uso de xilosa y glicerol incrementó en un 20% la conversión de PDO mientras que el licor de arroz con tratamiento ácido aumentó la síntesis de diol de 9 a 15 g.L⁻¹ en *K. pneumoniae* (Jin 2011). El uso de rastrojo y melazas de maíz fueron utilizadas como co-sustrato de glicerol para la producción de PDO en *C. diolis*. El rendimiento final a partir de glicerol fue del 85% y resultó ser una estrategia eficiente y económica (Xin 2016).

Objetivos

Dentro del marco general de la manipulación de bacterias para incrementar la síntesis de compuestos de interés biotecnológico, esta tesis se centró en el análisis de los efectos de diferentes reguladores globales. Una vez identificados los contextos metabólicos más adecuados, se realizaron manipulaciones adicionales para verificar que los incrementos en la síntesis de los metabolitos de interés provocados por la eliminación de los reguladores globales permanecían o se potenciaban en las cepas optimizadas.

Podemos destacar como objetivos principales de esta tesis de doctorado:

- Analizar el efecto de la manipulación de reguladores globales sobre el metabolismo central en *E. coli* bajo distintas condiciones de aireación
- Analizar los efectos en el contexto genético de la cepa BW25113 y compararlos con los resultados obtenidos en otras cepas de *E. coli*
- Estudiar la tolerancia de las distintas cepas a diversos tipos de estrés en diferentes condiciones de disponibilidad de oxígeno
- Evaluar la síntesis de compuestos de interés industrial en cada uno de los contextos metabólicos generados por la delección de los genes regulatorios en estudio, en distintas condiciones de aireación y diferentes medios
- Caracterizar el efecto de cada mutación y determinar los efectos particulares de cada una a través de análisis estadístico multivariado
- Detectar y optimizar los contextos genéticos más adecuados para síntesis de compuestos de interés biotecnológico y validar los más promisorios en cultivos en biorreactor a escala de laboratorio

Materiales y métodos

Materiales y métodos

Cepas, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

Las cepas de *E. coli* utilizadas a lo largo de este trabajo se detallan en la Tabla 1, junto a los plásmidos y oligonucleótidos utilizados. Las cepas fueron mantenidas a -70°C en LB conteniendo 20 % (m/V) de glicerol. Para cada experimento, a partir de estos glicerolados se estriaron placas de LB con el agregado del correspondiente antibiótico. Para el mantenimiento diario, se utilizaron pasajes sucesivos en placa en el mismo medio.

Características		Fuente
Cepas de <i>E. coli</i>		
BW25113	F ⁻ , $\Delta(\text{araD-araB})567$, $\Delta\text{lacZ4787}(\text{:rrnB-3})$, λ^{-} , rph-1, $\Delta(\text{rhaD-rhaB})568$, hsdR514	CGSC, Baba 2006
Δrob	Igual que BW25113, pero $\Delta\text{rob-721::kan}$	CGSC, Baba 2006
Δcra	Igual que BW25113, pero $\Delta\text{fruR786::kan}$	CGSC, Baba 2006
ΔarcA	Igual que BW25113, pero $\Delta\text{arcA726::kan}$	CGSC, Baba 2006
ΔcreC	Igual que BW25113, pero $\Delta\text{creC724::kan}$	CGSC, Baba 2006
Plásmidos		
pCP20 <i>Helper</i>	Plasmido usado para escindir el casete <i>kan</i> ; lleva la FLP λ de <i>S. cerevisiae</i> cl857 $\lambda\text{PR repA(Ts)}$, Ap ^R Cm ^R	Godoy 2016
pSBF2	Plasmido pDHK30 que lleva <i>fdh1</i> de <i>Candida boidinii</i> bajo el control del promotor lac, Km ^R	Berrios-Rivera 2002
pEcPck	Plasmido pTrc99A llevando <i>pck</i> de <i>E. coli</i> bajo el control del promotor lac, Ap ^R	Wang 2009
pEcppc	Plasmido pTrc99A llevando <i>ppc</i> de <i>E. coli</i> bajo el control del promotor lac, Ap ^R	Wang 2009
pET _{Lm}	Plasmido pBluescript II KS(-) conteniendo <i>adhE</i> de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ; Ap ^R	Mezzina 2017
pBBR1MCS-2:: <i>dha</i>	Plasmido pBBR1MCS-2 llevando los genes <i>dhaR</i> , <i>dhaG</i> , <i>dhaT</i> , <i>dhaB</i> , <i>dhaC</i> , <i>dhaE</i> , and <i>dhaF</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> GLC29; Km ^R	Flora 2015
pSEVA221:: <i>dha</i>	Plasmido pSEVA221 (amplio rango, oriRK2) llevando los genes <i>dhaR</i> , <i>dhaG</i> , <i>dhaT</i> , <i>dhaB</i> , <i>dhaC</i> , <i>dhaE</i> , and <i>dhaF</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> GLC29; Km ^R	Mezzina 2017
pPHB-KF	Plasmido pJP24 llevando los genes <i>phaCAB</i> from <i>Cupriavidus necator</i> y el casete <i>kan-FRT</i> del plasmido pKD4 (59), Ap ^R Km ^R	Godoy 2014
pSEVA328	Vector de amplio rango; oriRK2, oriT; Cm ^R	Silva-Rocha 2013
pADP2	Plásmido pBBR1MCS-2 llevando el gen <i>phaP</i> de <i>Azotobacter</i> sp. FA8, Km ^R	De Almeida 2011
pPhaP328	Plasmido SEVA328 llevando el gen <i>phaP</i> de <i>Azotobacter</i> sp. FA8, Cm ^R	Este trabajo

pQE30	Plásmido de origen ColE1, Ap ^R	Quiagen
pBRob	Plásmido pBBR1MCS2 de mediano número de copias, conteniendo el fragmento HindIII-BamHI conteniendo el gen <i>rob</i> de <i>E. coli</i> , Ap ^R	*Ver bibliografía
pSRob	Plásmido pSE380 de alto número de copias, conteniendo un fragmento de 926 pb Sall-SacI conteniendo el gen <i>rob</i> de <i>E. coli</i> , Ap ^R	Ariza 1995
Oligonucleótidos		
PhaP-F	ATT GGA TCC ACA CAG GAA ACA GCT ATG GCT TTT TTT GAT CTG	Este trabajo
PhaP _{Low}	TCG AAG CTT GCC GTC AGG CAG TCT T	De Almeida 2011

Tabla 1. **Listado de cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.**

Medio LB

Para el mantenimiento rutinario de las cepas, precultivos y protocolos de biología molecular (salvo que se indique otro medio) se utilizó medio LB (extracto de levadura 5 g.L⁻¹, triptona 10 g.L⁻¹, y NaCl 5 g.L⁻¹), o medio LB sólido conteniendo agar 1,5% (m/V).

Medios complejos para la validación cromatográfica

Para determinar la selectividad del método de cromatografía gaseosa para la cuantificación de PDO, además de LB se utilizaron caldo nutritivo o NB (conteniendo por litro: 5 g de peptona de carne y 3 g de extracto de carne) y medio definido para *Thermoanaerobacterium thermosaccharolitycum* o TSD (conteniendo por litro: 1,85 g de NH₄2SO₄; 0,05 g de FeSO₄.7H₂O; 1,0 g de KH₂PO₄; 1,0 g de MgSO₄; 0,1 g de CaCl₂.2H₂O, 2 g de citrato trisódico; 0,5 g de extracto de levadura; 0,002 g de ácido p-amino benzoico; 0,002 g de tiamina-HCl; 0,01 mg de vitamina B12; 0,12 g de metionina; 1 g de L-cisteína-HCl; y 0,002 g de resazurina).

Medio mínimo M9

Los cultivos en frasco agitado para la caracterización metabólica de las distintas mutantes y los ensayos de tolerancia se desarrollaron en medio mínimo M9 conteniendo Na₂HPO₄ 6 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 3,0 g.L⁻¹; NH₄Cl 1 g.L⁻¹; NaCl 0,5 g.L⁻¹; citrato férrico de amonio 0,06 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,04 g.L⁻¹; CaCl₂ 0,01 g.L⁻¹ pH inicial = 7. Las fuentes de carbono y la concentración de las mismas variaron según

el experimento. Las sales de Fe, Mg y Ca se autoclavaron por separado y se agregaron al medio antes de ser inoculado.

SOB, SOC y LB-CaCl₂

Para la transformación plasmídica, las células se crecieron en medio SOB (triptona 2 g.L⁻¹, extracto de levadura 5 g.L⁻¹, NaCl 8,56 mM, KCl 2,5mM; MgCl₂ 10mM; y MgSO₄ 10mM (ambas sales de magnesio se agregaron luego de autoclavar al resto de los componentes del medio en H₂O bidestilada). Para preparar células electrocompetentes se omitieron las sales de magnesio de forma de disminuir la cantidad de iones en el medio, y se agregó glicerol 30 g.L⁻¹. El SOC, para la recuperación post-transformación, posee la misma composición que el SOB, pero esta suplementado con glucosa 20 g.L⁻¹. Para la transformación rápida en placa se utilizó LB agar CaCl₂ 10 mM.

Antibióticos y aditivos

Los antibióticos utilizados y sus concentraciones finales fueron: Ap, 100 µg.ml⁻¹; Km, 50 µg.ml⁻¹ y Cm, 20 µg.ml⁻¹. En todos los casos, las soluciones de antibióticos se esterilizaron por filtración (membrana de acetato de celulosa de 0,22 µm de poro). Los inductores (IPTG y ácido m-toluico) y suplementos (vitamina B12, tiamina) también fue filtrados por membrana de 0,22 y agregados al medio oportunamente.

Cultivos alta y baja aireación en frasco agitado

Para los perfiles metabólicos de las cepas mutantes y los ensayos de tolerancia establecimos condiciones de cultivo de acuerdo a una combinación de la agitación y la relación de volumen del frasco (Vf)/volumen de medio de cultivo (Vm), como sigue:

- Cultivos en alta aireación: 200 rpm y Vm/Vf=1/10 en botellas de 50 ml tapadas con algodón
- Cultivos en baja aireación: 125 rpm y Vm/Vf=1/2 en viales de vidrio de 10 ml selladas con tapón de butilo y precinto de aluminio.

En todos los casos, se realizaron precultivos independientes por triplicado durante 24 hs a partir de 2-3 colonias frescas de placa de LB agar en las mismas condiciones que los cultivos finales, que

fueron inoculados en $DO_{600}=0,1$. El medio utilizado fue M9 glucosa 5 g.L⁻¹ y se realizaron los cultivos a 24 hs y 37 °C.

Cultivos sin aireación

Los cultivos se hicieron en medio mínimo M9 glucosa 5 g.L⁻¹ en tubos de 8 ml con tapa a rosca y llenos a tope con medio de cultivo. Los cultivos, inoculados en $DO_{600}=0,1$ a partir de precultivos incubados en baja aireación de 24 hs, se llevaron a cabo a 37 °C con una agitación vertical de 6 rpm, para evitar la sedimentación de la biomasa durante 24 hs.

Cultivos para la evaluación de la tolerancia

Se llevaron a cabo experimentos de exposición a compuestos estresantes en condiciones de alta y baja aireación, como se indicó más arriba. Se utilizaron distintos compuestos detallados en la Tabla 2, los cuales fueron agregados desde el tiempo 0 en los cultivos.

Compuesto	Baja aireación	Alta aireación
EtOH % (m/V)	4 y 4,8	4 y 4,4
ButOH % (m/V)	0,6	0,8
PDO % (m/V)	7	7
NaCl % (m/V)	3,5	3,5
Tetraciclina µg.ml ⁻¹	3,75	3,75
Azul de toluidina % (m/V) (placa)	0,02	

Tabla 2. Concentración de los distintos compuestos utilizados para evaluar la tolerancia de las cepas mutantes de reguladores globales. EtOH: etanol. ButOH: butanol. PDO: 1,3-propanodiol.

Para el caso de la cepa sobreexpresando el regulador Rob, se evaluó únicamente la tolerancia a los solventes EtOH, ButOH y PDO. Las concentraciones utilizadas de cada uno en cada condición se detallan en la Tabla 3.

Compuesto	Baja aireación	Alta aireación
EtOH % (m/V)	3	4 y 4,2
ButOH % (m/V)	0,6	0,8
PDO % (m/V)	5,6.7 y 8	--
Tetraciclina µg.ml ⁻¹	--	3, 6, 12 y 25

Tabla 3. Concentración de los distintos compuestos utilizados para evaluar la tolerancia de E. coli sobreexpresando rob. EtOH: etanol. ButOH: butanol. PDO: 1,3-propanodiol.

En el caso de compuestos volátiles (EtOH y ButOH), los viales se taparon con tapones de butilo y sellos de aluminio, al igual que se procedía con los cultivos no aireados, para evitar la evaporación de los alcoholes.

En el caso del estrés redox inducido por toluidina, se realizaron placas de agar M9 con la adición de azul de toluidina $2 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ concentración final. Estas placas fueron estriadas con diluciones de 10^{-5} de precultivos *overnight*, y el diámetro de las colonias se determinó después de 24 horas a 37°C . Además, se evaluó el efecto de la toluidina utilizando *spots* de $5 \mu\text{l}$ sembrados en placa, utilizando los precultivos sin dilución y diluciones de 10^{-3} , 10^{-5} y 10^{-7} .

Cultivos de cepas recombinantes para producción de biocompuestos

i) Producción de EtOH en baja aireación.

Según las condiciones anteriormente descritas se realizaron cultivos en LB suplementado con 10 g de glucosa o glicerol por litro a 37°C durante 24 hs. Todas las cepas mutantes y la salvaje fueron transformaron con el plásmido pET_{Lm}. La expresión de *adhE* se indujo con 1 mM de IPTG (isopropil-D-tiogalactopiranosido) en fase exponencial, cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,8.

ii) Producción de PDO

En el caso de PDO, las cepas transformadas con el plásmido pBBR1MCS-2::*dha* (Da Silva 2015) se crecieron en medio mínimo M9 o LB en condiciones de baja y alta aireación. En todos los casos, el medio fue suplementado con glicerol (se agregaron 10 y $30 \text{ g}.\text{L}^{-1}$ para aireación baja y alta, respectivamente) y $1,5 \mu\text{M}$ de vitamina B12. Cuando se utilizó pPhaP328, se indujo la expresión de *phaP* con kanamicina agregada en fase exponencial ($\text{DO}_{600}=0.8$).

iii) Producción de PHB

Las cepas productoras de PHB transformadas con el plásmido pPHB-KF se crecieron en LB con glucosa $10 \text{ g}.\text{L}^{-1}$ en condiciones de baja aireación en botellas de vidrio de 100 ml.

En todos los casos, se añadieron los antibióticos kanamicina y ampicilina.

Cultivos para la optimización de ácido succínico

Las cepas de tipo salvaje y Δcra , transformadas con pEcppc o pEcpc y/o pSBF2, se llevaron a cabo en condiciones no aireadas como se describió anteriormente durante 24 hs en medio M9, LB o M9 TE, según los requerimientos nutricionales de las bacterias. En todos los casos, se añadió un

precultivo en condiciones de baja aireación previo al precultivo no aireado para obtener mayores cantidades de biomasa. El medio M9 TE contenía, adicionalmente al M9, por litro de solución: 0,5 g de extracto de levadura; 5 µg de tiamina; 2,78 µg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 1,98 µg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$; 2,81 µg de $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,17 µg de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,29 µg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ en 1N de HCl). Además, el medio de cultivo también contenía 100 mM de NaHCO_3 como fuente de CO_2 .

La expresión de *fdh1*, *ppc* y *pck* se indujo mediante la adición de IPTG 0,5 mM desde el inicio del cultivo.

Cultivos para la optimización de PDO

i) Cultivos en frasco agitado

Los ensayos se realizaron al igual que los cultivos anteriores para la producción de PDO en condiciones de alta aireación utilizando LB o medio SDM (medio M9 modificado conteniendo por litro: 6,0 g de Na_2HPO_4 , 3,0 g de KH_2PO_4 , 0,5 g de NaCl, 2,0 g de NH_4Cl , 0,4 g de MgSO_4 , 0,01 g de CaCl_2 y 0,06 g de citrato hierro (III) de amonio y 5 g de extracto de levadura). Se agregó glicerol 30 g.L⁻¹ como fuente de carbono y vitamina B12 como cofactor para la síntesis del diol. En las cepas transformadas con pPhaP328 o pADP2, para la expresión de *phaP*, se agregaron los inductores ácido m-toluico 0,1 mM o 0,5 mM e IPTG 1mM, respectivamente. También se agregaron al cultivo kanamicina y/o cloranfenicol, según la combinación de plásmidos utilizada.

ii) Cultivos en biorreactor

Se utilizaron como inóculos 75 ml de cultivos en medio LB crecidos en alta aireación en erlenmeyers. Para los cultivos, utilizamos un biorreactor *Bioengineering* de 3,7 L con 1,5 L de medio SDM o LB. En todos los casos, el pH se ajustó a 7 mediante la adición de NaOH 2 M y H_2SO_4 1 M. El oxígeno disuelto se mantuvo al 20% durante todo el cultivo mediante un modo en cascada de agitación, y el flujo de aire suministrado se fijó entre 0,5 y 1,5 litros.min⁻¹.

La temperatura fue mantenida a 37 °C durante toda la fermentación y se monitorearon el crecimiento, la biomasa, el PDO y el glicerol en sobrenadante.

Se implementaron diferentes estrategias de cultivo para la producción de PDO:

- a) Fermentaciones en lote: se agregó glicerol hasta la concentración final por única vez y se creció el cultivo durante 24 hs.

- b) Lote repetido con fuente de carbono: cada vez que el glicerol inicial era consumido por debajo de los 5 g.L⁻¹, se alimentó el cultivo de forma de reponer hasta 30 g.L⁻¹ el sustrato. La fermentación se realizó durante 48 hs.
- c) Lote repetido con medio completo: se realizó el mismo procedimiento que en el caso anterior, pero adicionando glicerol concentrado junto con medio completo.

Manipulaciones genéticas y técnicas de biología molecular

Extracción de Plásmidos

La extracción se realizó a partir de 3-4,5 ml de cultivo, en función del número de copias del vector, crecidos *overnight* en LB (con el antibiótico correspondiente). Se centrifugaron durante 5 minutos a 5000 rpm para obtener el pellet de células. Este se resuspendió en 150 µl de buffer 1 (buffer TE= Tris-HCl pH 8 10 mM, EDTA pH=8 1 mM), luego se agregaron 150 µl de buffer 2 (se prepara en el momento: NaOH 200 mM, SDS 1% v/v), se mezcló por inversión, se incubó 5 min a temperatura ambiente y luego se adicionaron 150 µl de buffer 3 (acetato de potasio pH=4,8 3 M). Se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se tomó cuidadosamente el sobrenadante. A dicho sobrenadante se adicionaron 900 µl de EtOH absoluto, se centrifugó durante 20 min a 13000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó con 500 µl de EtOH 70 %. Luego se descartó el EtOH y se dejó secar 30 min a 37 °C para que se evapore el EtOH remanente. Una vez eliminado todo resto de EtOH se resuspendió en 50 µl de H₂O bidestilada.

En casos donde fue necesaria la obtención de plásmidos con mayor grado de pureza (cortes con enzimas de restricción y posterior ligado) se utilizó un kit comercial, Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), y se procedió siguiendo las especificaciones del fabricante.

Digestión con enzimas de restricción

La digestión con enzimas de restricción (marca New England Biolabs o Promega) se realizó siguiendo protocolos estándares y las instrucciones de los fabricantes.

Purificación de DNA

Se utilizaron los kits comerciales de Qiagen (Qiaex II gel extraction kit) para la purificación de fragmentos de DNA obtenidos por reacciones de PCR o tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones, siguiendo las especificaciones del fabricante.

Reacciones de ligado.

Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de Promega o New England Biolabs, siguiendo las especificaciones del fabricante. La relación DNA inserto/DNA vector fue de 3:1 como mínimo. La reacción se llevó a cabo por un periodo de 16 a 18 hs a 16°C u *overnight* a 4 °C.

Electroforesis en geles de agarosa

Para la visualización y la posterior purificación de fragmentos de DNA obtenidos de reacciones de PCR o de cortes con enzimas de restricción con rangos de tamaño de 3000 a 500 pb se utilizó una concentración de agarosa de 1 % (m/V). Las electroforesis se realizaron utilizando buffer TAE a 100 volts en cubas de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Como marcadores de peso molecular se utilizó la escalera de 100 bp o 1 kb de Promega. Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio ($0,5 \text{ g.ml}^{-1}$) durante 15 min. El DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV y los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

Cuantificación de DNA

La calidad del DNA obtenido en diferentes protocolos se verificó por electroforesis en gel de agarosa. La cuantificación del mismo se realizó en un Nanodrop 2000 de Thermo Fisher Scientific, a partir de un volumen de 2 ul de solución.

Preparación de células competentes

Para la obtención de células competentes de las diferentes cepas de *E. coli* requeridas se inocularon 10 ml de LB con dos o tres colonias aisladas de un cultivo de 24 hs realizado en medio sólido y se incubaron *overnight* a 37°C y 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 15-50 ml de SOB-glicerol

30 g.L⁻¹, en un erlenmeyer de 150-500 ml, partiendo de una DO_{600nm} inicial de 0,05. Se incubó a 37°C y 200 rpm alrededor de 3 horas o hasta alcanzar una DO de 0,5-0,7. Luego se procedió a incubar durante 10 min a 4°C y se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C). Los pasos posteriores varían según si se prepararon células competentes por tratamiento químico (quimiocompetentes) o electrocompetentes.

i) Quimiocompetentes en medio líquido

El pellet se resuspendió en 8 ml de una solución de CaCl₂ 0,1 M fría, se incubó 1 hora a 4°C y se centrifugó por 10 min a 4 °C a 4000 rpm. Se resuspendió el pellet suavemente en 2 ml de CaCl₂ 0,1 M y glicerol 10 % (m/v) y se almacenó hasta su uso a -70 °C en alícuotas de 50 ul.

ii) Quimiocompetentes en medio sólido

A partir de una placa de LB agar de rutina, se crecieron las células en LB CaCl₂ 10 mM *overnight*. Se resuspendieron 3-6 colonias en CaCl₂ 0,1 M y se procedió como en el caso anterior.

iii) Electrocompetentes

El pellet se lavó tres veces con 25 ml de glicerol 10 % (m/v) en H₂Odd y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución de lavado. También se almacenaron en -70 °C en alícuotas de 50 ul.

Transformación de células competentes.

- i) Quimiocompetentes. Para realizar ensayos de transformación en células quimiocompetentes se agregaron 5-10 µl de DNA (10-50 ng), a 50 µl de células competentes, se incubaron 30 min en hielo, luego se aplicó un golpe térmico a 42°C durante 90 segundos y nuevamente se incubó en hielo por 10 min.
- ii) Electrocompetentes. 2 µl de DNA se agregaron a 50 µl de células competentes. La electroporación se efectuó en un electroporador BioRad Micro PulserTM en cubas de 0,2 cm, en el programa 2 que ofrece el equipo.

Para la recuperación de ambos tipos de células competentes se agregó 1 ml de SOC y se incubó 1 hs a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación se centrifugaron las células 5 min a 5000 rpm y se sembró el pellet celular en placas con medio de selección según correspondiese utilizando bolitas de vidrio para esparcir las células.

Remoción del casete de Km de las cepas Keio

Para remover, de la célula, el casete de kanamicina, se transformaron las bacterias con el plásmido pCP20 el cual contiene la recombinasa FLP de *S. cerevisiae* y el gen *cat* que confiere resistencia al

cloranfenicol. Se seleccionaron las células KmS CmR y se corroboró la pérdida del casete en cuestión por contraselección en kanamicina. El plásmido pCP20 (el cual es termosensible) se curó repicando las cepas dos veces a 42°C.

Construcción de pPhaP328

El plásmido pADP2 fue usado como templado para la amplificación por PCR de un fragmento BamHI-HindIII conteniendo el gen *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8. EL producto de PCR fue chequeado por electroforesis y luego digerido y ligado en el plásmido pSEVA328. Este plásmido fue chequeado nuevamente por electroforesis y PCR.

Manipulación de proteínas

Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Cuando fue necesario corroborar la sobreexpresión de PhaP, se corrió el extracto proteico en un gel de poliacrilamida. Las electroforesis desnaturalizantes en presencia de dodecilsulfato de sodio se realizaron en una cuba de electroforesis para proteínas vertical (10 cm × 10 cm × 1 mm; BioRad Labs.). Se utilizó una concentración de acrilamida en el gel separador de 15% (m/V), mientras que la concentración en el gel concentrador fue de 4,5% (m/V). La solución para la corrida electroforética contuvo Tris 25 mM; glicina 0,2 M; y SDS 3,5 mM. La electroforesis se desarrolló con amperaje constante (20 mA) hasta que las muestras atravesaron el gel concentrador; a partir de ese momento la corriente se aumentó a 30 mA.

Western blot

Luego de la electroforesis, se incubó el gel en bufer de transferencia durante 10 minutos (Tris 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20 % v/V). Se utilizó una membrana de PVDF y se la activó sumergiéndola en una solución de agua-metanol durante 20 minutos. A continuación, se armó el sándwich de transferencia: 3 papeles Whatman embebidos en buffer de transferencia, membrana, gel, 3 papeles Whatman embebidos en buffer de transferencia. El sándwich se colocó en un aparato de transferencia, semiseco (TE70, ECL Semi-Dry Transfer Unit, Amersham Biosciences) y se corrió a 80 miliamperes durante 40 min.

Para realizar el bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche en TBS Tween 0,5 % con 5 % de leche descremada en la heladera. Al día siguiente la membrana se lavó dos veces con TBS y a continuación se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora con una dilución 1/1000 del antisuero anti-PhaP (según Mezzina 2014) en TBS Tween 0,1% con 5% de leche descremada. Luego, se realizaron 3 lavados con TBS Tween 0.5% y un último lavado con TBS.

Posteriormente, se incubó durante 1 hora con una dilución 1/10000 del anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (NEN Life Sciences Products) en TBS Tween 0,1 % con 5 % de leche descremada. Luego, se realizaron 3 lavados al igual que en el caso anterior. Se reveló con una mezcla de 1 ml de solución A + 1 ml de solución B + 0,64 µl de H₂O₂. Luego de la incubación, se expuso la membrana en una cámara G-Box (Syngene).

Solución A: 0,1 ml de luminol 250 mM; 0,044 ml de ácido cumárico 90 mM; y 1 ml Tris 1M pH=8.5 (volumen final de 10 ml).

Solución B: 0,1 ml Tris 1M pH=8,5 y 0,9 ml H₂O destilada (volumen final 1 ml).

Métodos analíticos

Determinación de biomasa.

El crecimiento celular se estimó por turbidometría, registrando la DO₆₀₀ del cultivo (o una dilución apropiada del mismo) en un espectrofotómetro GeneSys5 UV-Vis (Spectronic Instruments Inc., Rochester, New York, EE.UU.). La concentración celular se expresó como g biomasa (peso seco).L⁻¹ de cultivo. Con este fin, se tomaron muestras de 10 ml de los cultivos, se centrifugaron (5000 rpm, 4°C, durante 6,5 min) y el sedimento celular fue secado en estufa a 65°C durante 48 hs.

Cuantificación de ácidos en sobrenadante

Los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de muestras de 1 ml fueron diluidos 1:5 en agua bidestilada y filtrados a través de membranas de 0,22 µm de poro, y se guardaron a 4°C hasta el análisis por cromatografía líquida de alta presión. Los ácidos de fermentación (citrato, piruvato, acetato, D-lactato, formiato y succinato) fueron detectados utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta presión (HPLC; Shimadzu Scientific Instruments, Columbia, Maryland, EE.UU.) con una columna de intercambio de cationes (Aminex HPX-87H; BioRad Labs., Hercules, California, EE.UU.) y un detector UV-Vis (SPD-10A, Shimadzu Scientific Instruments). La elución se desarrolló

utilizando H_2SO_4 5 mM como fase móvil con un flujo constante de 0,6 ml/min, y la columna fue operada a 50°C.

Cuantificación de PHB

Para cuantificar la cantidad de PHB intracelular, los cultivos se centrifugaron y los sobrenadantes se descartaron. La cantidad de polímero se determinó mediante GC como se describió previamente (Nikel 2006). Los gránulos se liofilizaron durante la noche y 10 mg se colocaron en tubos con tapa a rosca con recubrimiento interno de teflón. Los sedimentos se calentaron a 100 °C durante 2 hs con 2 ml de cloroformo y 2 ml de ácido sulfúrico al 15% (v/v) diluidos en metanol. Después de enfriar a temperatura ambiente, la fase acuosa se descartó y las muestras se lavaron dos veces con 2 ml de agua desionizada y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. Los ésteres metílicos resultantes de polihidroxibutirato (PHB) se cuantificaron en un cromatógrafo gaseoso 7820 A equipado con un detector de ionización de llama (FID) y un muestreador automático de líquidos ALS 7693 (Agilent, CA, EE. UU.). Se usó una columna no polar HP-5 (30 m, espesor de película de 0,25 μm y diámetro interno de 0,32 mm). El horno GC se calentó inicialmente a 60 ° C durante 3 minutos, luego a 110 ° C con una rampa de calentamiento de 45 ° C.min⁻¹ y se mantuvo durante 1,5 minutos. El inyector y el FID se ajustaron a 250 ° C y 300 ° C, respectivamente. La relación de *split* fue de 45: 1 y se inyectó 1 μl de volumen de muestra.

Determinación de glucosa en sobrenadante.

La glucosa remanente en sobrenadantes se midió, procesando las muestras de la misma forma que lo descrito para la determinación de ácidos y utilizando un kit comercial de Wiener Laboratorios SAIC, Rosario, Argentina. La reacción colorimétrica se midió con un espectrómetro UV-Vis ajustado a 505 nm. Para la cuantificación absoluta se prepararon patrones de cada sustancia con concentraciones conocidas de las mismas.

Determinación de etanol, PDO y glicerol

Las muestras se centrifugaron y se filtraron como se indicó para los ácidos orgánicos y se diluyeron 250 μl de cada muestra en 750 μl de EtOH o acetona para la determinación de glicoles y EtOH, respectivamente. Finalmente, las diluciones se agitaron en vórtex durante 1 minuto y se

centrifugaron a 9000 rpm y 3 minutos para la precipitación de sales. Se detectó mediante el sistema de cromatografía gaseosa antes mencionado. Se usó columna capilar HP-INNOWAX (30 m, espesor de película de 0,25 μm y diámetro interno de 0,25 mm) con N_2 como gas portador. Para la medición de glicoles, el horno GC se calentó a 185 ° C durante 3 min, luego se calentó hasta 220 ° C a una velocidad de 40 °C.min⁻¹, y se mantuvo durante 1 min. Las temperaturas del inyector y del FID se ajustaron a 290 ° C y 300 ° C, respectivamente, y el flujo de la columna de gas fue de 2,5 ml.min⁻¹. Para EtOH, la temperatura del horno se ajustó a 35 ° C durante 8 min. Las temperaturas del inyector y del detector fueron de 150 ° C y 300 ° C, respectivamente. El flujo de nitrógeno fue de 1 ml.min⁻¹. La relación de división fue 30: 1 y 90: 1 para glicoles y EtOH, respectivamente.

Validación analítica de la determinación de PDO y glicerol

Linealidad

La linealidad se evaluó mediante cinco inyecciones de 10 estándares de diferentes concentraciones. Los rangos probados fueron: 0,01–20 g.L⁻¹ para el PDO y 0,025–30 g.L⁻¹ para el glicerol. La curva se construyó mediante regresión de cuadrados mínimos.

Resolución y factor de asimetría

Se determinó la resolución como: $R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$, donde t_{R2} y t_{R1} son los tiempos de retención de los dos componentes; y W_2 y W_1 son los anchos correspondientes en las bases de los picos obtenidos extrapolando los lados relativamente rectos de los picos hasta la línea de base.

La asimetría o *tailing* se calculó como: $T = W_{0,05} / 2f$, donde $W_{0,05}$ es el ancho del pico al 5 % de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5 % de la altura desde de la línea base.

Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Los LOD y LOQ fueron calculados como las concentraciones que generaron señales en el detector cromatográfico de tres y diez veces más altas que la línea de base, respectivamente.

Precisión

La precisión fue probada en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. La repetibilidad fue evaluada mediante 6 inyecciones consecutivas del mismo estándar de PDO o glicerol, en tres niveles de concentración diferentes: 0,1-1-20 g.L⁻¹ para el PDO y 0,5 - 6 -20 g.L⁻¹ para el glicerol.

La precisión intermedia se determinó inyectando un estándar de cada compuesto preparado de forma independiente en 6 días consecutivos a partir de la misma solución madre. Se probó 1 g.L⁻¹ de PDO y 10 g.L⁻¹ de glicerol.

Para la reproducibilidad, se realizaron inyecciones de seis muestras que fueron preparadas de forma independiente durante 6 días a partir de 6 soluciones madres diferentes. La concentración de los estándares fue: (0,5 g.L-3 g.L-10 g.L), para PDO y (4 g.-7,5 g.L-20) g.L⁻¹, para glicerol.

Exactitud

La exactitud se evaluó en un blanco de medio M9, al cual se le agregaron por separado tres cantidades conocidas de PDO o glicerol incluidas dentro del rango de la curva de calibración, pero diferente de los 10 niveles de concentración utilizados para dicho fin. Los estándares utilizados fueron: (0,3-1,5-7,5) g.L⁻¹, para PDO y (5-7,5-25) g.L⁻¹, para glicerol. Para cada concentración se usaron seis muestras preparadas independientemente. Los porcentajes de recuperación fueron calculados por comparación de las concentraciones predichas por la curva de calibración vs. la señal del detector.

Estabilidad

La estabilidad de las muestras de PDO (1 g.L⁻¹) y glicerol (10 g.L⁻¹), preparadas en M9 y diluidas en EtOH , se probó mediante inyecciones realizadas en 6 puntos temporales diferentes (0, 1, 3, 5 y 24 hs). Se utilizaron 2 condiciones de temperatura diferentes: ambiente y -20 °C.

Selectividad y robustez

Para determinaciones de selectividad, se prepararon muestras diluyendo las soluciones madre de PDO y glicerol en LB, M9, TSD, NB y agua. Las concentraciones finales fueron 3 g.L⁻¹ de PDO y 7,5 g

de g.L^{-1} de glicerol. Para evaluar robustez, se realizaron determinaciones en muestras en M9 conteniendo 3 g.L^{-1} de PDO y $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ de glicerol a pH 5, 7 y 8. El pH fue ajustado con utilizando HCl (2 M) o NaOH (10 M).

Análisis estadístico de los resultados

Para el análisis univariado se utilizó la prueba T de Student a 2 colas con una significancia de $p < 0,05$. El análisis descriptivo multivariado se realizó por análisis de componentes principales no supervisado (ACP), análisis discriminante y análisis de agrupamiento jerárquico, utilizando el software InfoStat. Estas herramientas se usaron para identificar tendencias de separación y visualizar la respuesta de las cepas de trabajo en la variedad de condiciones probadas. Un total de 21 variables se utilizaron en el análisis estadístico, incluidos los ensayos de tolerancia, los perfiles metabólicos y el rendimiento de biomasa de las cepas en un medio mínimo (Tabla 4). El análisis de agrupamiento jerárquico se calculó utilizando el enfoque de distancia euclidiana y los grupos se agruparon utilizando el método de Ward.

Variable	Medio de cultivo	Disponibilidad de O ₂	
		Alta aireación	Baja aireación
Biomasa (DO ₆₀₀)	M9 glucosa	X	X
Produccion específica de metabolitos en cepas no recombinantes (g. g peso seco⁻¹)			
Piruvato	M9 glucosa		X
Succinate	M9 glucosa		X
Lactato	M9 glucosa		X
Formiato	M9 glucosa		X
Acetato	M9 glucosa		X
Etanol	M9 glucosa		X
Produccion específica de metabolitos en cepas no recombinantes (g. L⁻¹)			
Etanol	M9 glucosa		X
PDO	M9 glicerol/LB glicerol	X	X
PHB	M9 glucosa		X
Ensayos de tolerancia (% de crecimiento relativo)		M9 glucosa	
Etanol	M9 glucosa	X	X
PDO	M9 glucosa	X	X
Butanol	M9 glucosa	X	X
NaCl	M9 glucosa	X	X
Azul de toluidina	M9 agar + glucosa	Placas de Petri	

Tabla 4. Variables incluidas en los análisis por componentes principales para la obtención de patrones fenotípicos.

Capítulo I

CAPITULO I. Efecto de los reguladores globales sobre el metabolismo y la tolerancia a estrés en *E. coli*

Prefacio

El primer capítulo de esta tesis está dedicado a la caracterización fisiológica de mutantes con deleciones en los genes que codifican cada uno de los reguladores globales en estudio (ArcA, CreC, Cra y Rob). Dado que las líneas de trabajo de nuestro laboratorio se enfocan en la obtención de productos de interés biotecnológico, nos centramos en el estudio del metabolismo central, y en particular, de las vías fermentativas. La elección de *E. coli* para nuestras investigaciones se debe a que este microorganismo no sólo es uno de los principales modelos de estudio en microbiología, sino que además es una de las herramientas biotecnológicas a la que más se acude a la hora de buscar sistemas sencillos y eficaces de producción de compuestos biológicos de interés industrial. Consiguientemente, desenmarañar las complejas redes regulatorias que controlan su metabolismo es de gran valor a la hora de diseñar estrategias con fines biotecnológicos.

Como se dijo en la introducción, la elección de estos reguladores se debe a varios motivos. Por un lado, hace años se estudian en nuestro laboratorio los reguladores ArcA y CreC. Como ya se mencionó, manipulaciones en estos dos reguladores llevaron a la obtención de cepas sobreproductoras de PHB, EtOH y succinato, y permitieron obtener información valiosa acerca del efecto de estas manipulaciones sobre el metabolismo central del carbono y la caracterización de distintas mutantes de la cepa de *E. coli* K1060 (Ruiz 2012). Por su parte, el regulador Cra, inicialmente descrito como el regulador del operón fructosa en *Salmonella typhimurium* y *E. coli* (Chin 1987), fue categorizado pocos años después como regulador global en *E. coli* (Ramseier and Saier 1996) debido a que se observó que interviene en la regulación de numerosos operones involucrados en el catabolismo de hidratos de carbono, sobre todo en la glucólisis y el ciclo de Krebs, reprimiendo y activando simultáneamente ambos mecanismos. Por último, la manipulación de Rob, cuyo gen es adyacente al operón *creC* y está muy próximo a *arcA*, se ha utilizado como estrategia para el aumento de la tolerancia a solventes orgánicos, antibióticos y metales pesados en *E. coli*. Aunque se efecto sobre el metabolismo no se ha analizado en profundidad, se sabe que este regulador global también está involucrado en la regulación de genes de la vía de la glucólisis.

En los trabajos anteriores realizados en el laboratorio se estudiaron los efectos de mutaciones en reguladores globales en la cepa K1060, la cual no está secuenciada, por lo que no se disponía de toda la información necesaria. Debido a ello, para los estudios descritos en esta tesis se decidió cambiar el modelo de estudio, a fin de disponer de la mayor cantidad de información posible. Una de las cepas de *E. coli* más utilizada tanto en estudios genéticos y fisiológicos como en aplicaciones

biotecnológicas y modelado metabólico ha sido la cepa BW25113 (Baba 2006 y 2008), cepa de genoma caracterizado y secuenciado (Grenier 2014).

Con las mutantes $\Delta arcA$, $\Delta creC$, Δrob y Δcra de esta cepa se realizaron cultivos en frasco agitado en distintas condiciones de aireación obteniéndose, entonces, los perfiles metabólicos en condiciones de baja aeración en frasco agitado y sin aeración en tubos sellados. Esto último es relevante, ya que la baja disponibilidad de oxígeno muchas veces está ligada a baja productividad, en especial en aquellos compuestos que requieren mucho poder reductor para su síntesis y, por otro lado, el costo energético derivado, entre otros factores, del requerimiento de oxígeno, es fundamental en los procesos de síntesis. Estas condiciones se utilizaron a fin de favorecer el metabolismo fermentativo y, por ende, la síntesis de ácidos orgánicos y EtOH. Además, se obtuvieron las curvas de crecimiento en condiciones de baja aireación y las tasas de crecimiento para cada cepa. En todos los ensayos se utilizó medio mínimo M9 suplementado con glucosa 0,5 % (m/V).

Estos ensayos permitieron:

- a. Conocer la distribución de carbono en cada condición de cultivo y en cada mutante y estudiar su potencial uso en procesos biotecnológicos.
- b. Comparar los efectos de cada una de las mutaciones con los obtenidos previamente en otras cepas, principalmente aquellas menos caracterizadas y/o secuenciadas. En base a estos datos, se identificaron posibles efectos cepa dependientes.

En la segunda parte de este capítulo se analizó el efecto de las deleciones en los reguladores globales descritos sobre la tolerancia a compuestos de distinta naturaleza. Los bioprocesos industriales están asociados a cultivos de alta densidad, en los que las células están expuestas a varios tipos de estrés, incluido el estrés osmótico y redox y altas concentraciones de bioproductos, algunos de los cuales pueden ser citotóxicos (Goulas 2016). Estudios previos realizados con cepas que contienen mutaciones en diferentes reguladores globales mostraron cambios en la tolerancia a varios químicos y otros factores de estrés (Okochi 2008). Debido a ello, la posibilidad de que los reguladores analizados en el presente trabajo pudieran afectar la tolerancia a diferentes agentes causantes de estrés se estudió como un medio para evaluar la aptitud potencial de los mutantes para ser utilizadas en procesos biotecnológicos. Se determinó la tolerancia de las cepas mutantes al estrés osmótico (NaCl) y a los bioproductos EtOH, ButOH y PDO. También se determinó la sensibilidad a antibióticos y al estrés redox causado por azul de toluidina, ya que el fenotipo *dye*, un aumento en la sensibilidad a este colorante redox atribuido a la acumulación de especies reactivas de oxígeno

(ERO) debido a una mayor tasa de consumo de oxígeno, fue uno de los primeros efectos asociados a la pérdida de ArcA (Ruiz 2006). Para esto, se llevaron a cabo cultivos en frasco agitado en condiciones de alta y baja aireación en M9 glucosa, como se mencionó más arriba, y se estudió el crecimiento bacteriano en presencia de los distintos compuestos relativizando la biomasa siempre a condiciones de crecimiento sin agente estresante. De esta manera se logró obtener información sobre dos características relevantes en este estudio:

- a. La implicancia de los distintos reguladores sobre la respuesta a estrés en general
- b. El potencial de estas mutantes para ser usadas en procesos de síntesis de compuestos de interés industrial

Por último, a fin de caracterizar los fenotipos generados por cada mutante, implementamos análisis de estadística multivariada que permitieron considerar a la vez todos los hallazgos que se desprendieron de los análisis anteriores. De esta manera se pudieron identificar patrones característicos para cada uno de los contextos genéticos.

Podemos resumir los objetivos específicos de este capítulo en los siguientes puntos:

- Caracterizar el crecimiento y el perfil de ácidos de todas las mutantes en distintos niveles de aireación.
- Estudiar la síntesis de EtOH en condiciones de baja aireación
- Evaluar el efecto de las mutaciones sobre la tolerancia a distintos tipos de estrés bajo distintas condiciones de aireación
- Caracterizar el efecto de la sobreexpresión de Rob en relación a la tolerancia a alcoholes
- Buscar patrones característicos para cada mutación mediante análisis estadístico multivariado

Parte de los resultados que se presentan en este capítulo han sido publicados en el siguiente trabajo:

- Egoburo, D. E., Peña, R. D., Álvarez, D. S., Godoy, M. S., Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2018). Microbial Cell Factories à la Carte: Elimination of Global Regulators Cra and ArcA Generates Metabolic Backgrounds Suitable for the Synthesis of Bioproducts in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(19), e01337-18.

Caracterización del crecimiento y el metabolismo de mutantes de reguladores globales

Biomasa y tasa de crecimiento en ausencia de los reguladores Rob, Cra, ArcA y CreC

Como aspecto fundamental para caracterizar cada mutante en comparación con la cepa salvaje, estudiamos el crecimiento en medio mínimo M9 y glucosa como fuente de carbono. Debido al efecto pleiotrópico de las mutaciones en reguladores globales, justamente por la regulación ejercida en múltiples genes diana, su efecto sobre el crecimiento no es trivial ni predecible. Los ensayos fueron llevados a cabo en distintas condiciones de aireación, ya que por ejemplo en mutantes $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ la disponibilidad de oxígeno afecta el fenotipo resultante de estas deleciones de forma diferente en cada contexto genético.

El crecimiento final tanto en condiciones de baja como alta aireación arrojó resultados similares, aunque con algunas diferencias significativas. Utilizando glucosa como sustrato para la obtención de carbono y energía, las mutantes Δcra y $\Delta arcA$ crecieron menos que la cepa salvaje, pero no hubo diferencias significativas entre el control y las mutantes Δrob y $\Delta creC$ en ninguna de las condiciones de aireación analizadas (Figura 14).

Estos resultados fueron los esperados, ya que en trabajos previos se describió un aumento del flujo de carbono en la glucólisis y una disminución en la expresión de las enzimas involucradas en el metabolismo aeróbico en las mutantes *cra* (Ciclo de Krebs, vía del glioxilato y pentosas fosfato) (Ow 2007, Shimada 2011, Yao 2013), con lo cual el rendimiento de biomasa tiende a disminuir. Esto también tiene consecuencias en el consumo de glucosa, lo cual veremos más adelante en este capítulo. En el caso de las mutantes $\Delta arcA$, la disminución en la biomasa es similar a la que se había observado en la cepa K1060 en medio mínimo (Nikel 2008). Además, cuando estas cepas se utilizaron para producir EtOH o PHB, se observó que redirigían el carbono hacia estos compuestos reducidos, alcanzando menores valores de biomasa final (Nikel 2006 y 2008).

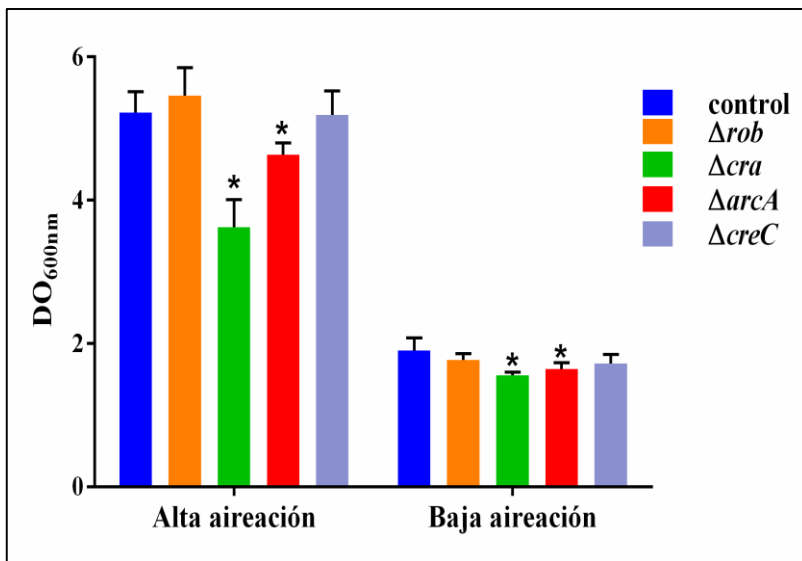


Figura 14. Crecimiento final luego de 24 hs de cultivo en medio mínimo en distintas condiciones de aireación.

Las cepas utilizadas fueron la BW25113 (control) y mutantes de cada regulador, crecidas en M9 suplementado con glucosa 0,5% (m/V). (*) indica diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje (Prueba T a 2 colas, $p < 0,05$). Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar ($n=6$).

El próximo paso, entonces, fue estudiar si además de la diferencia en biomasa final a 24 hs de cultivo, también la tasa de crecimiento máxima era distinta en fase exponencial. Nos interesó en particular estudiar condiciones de baja aireación, ya que las mismas favorecen la producción de ácidos orgánicos y además son condiciones sostenibles desde el punto de vista. Como se ve en la Figura 15, las curvas de crecimiento no reflejan gran diferencia salvo para las cepas Δcra y $\Delta arcA$, las cuales alcanzan una biomasa menor a las 24 hs, como ya mencionamos, y para el caso de la mutante Δcra la biomasa es menor con respecto a la cepa control desde el inicio de la fase exponencial del crecimiento.

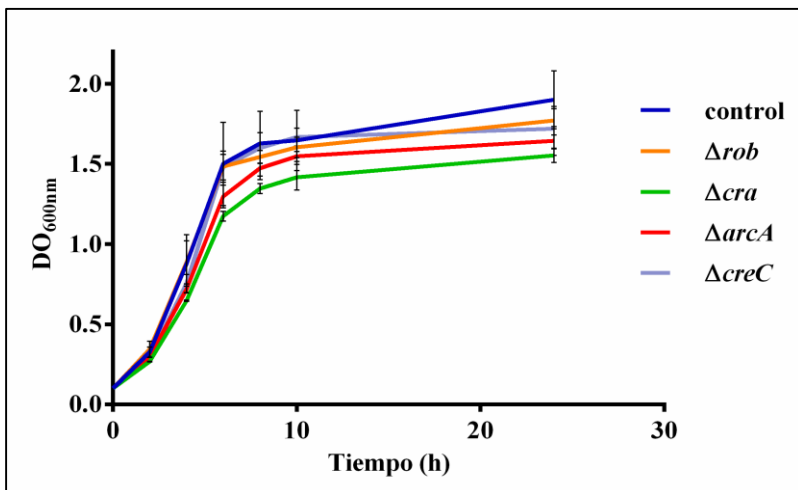


Figura 15. Curva de crecimiento de todas las cepas en medio M9 glucosa 0,5% durante 24 hs en condiciones de baja aireación. Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).

La velocidad de crecimiento teniendo en cuenta la tasa de crecimiento máxima no fue diferente para la mayoría de las mutantes (μ_{max}) (Tabla 5). En este caso, el hecho de que la cepa $\Delta arcA$ haya

acumulado una biomasa menor, sugiere que la misma disminuye la velocidad de formación de biomasa luego de la fase exponencial del crecimiento, como se ve además en la Figura 14. En cambio, la mutante Δcra tiene una μ_{\max} significativamente menor comparada con la cepa salvaje. Una vez más, esto tiene sentido cuando tenemos en cuenta la desregulación causada por la ausencia del regulador Cra, como se dijo más arriba.

Cepa	Control	Δrob	Δcra	$\Delta arcA$	$\Delta creC$
Umax	0,46±0,03	0,45±0,01	0,42±0,01*	0,43±0,01	0,45±0,01

Tabla 5. Tasa de crecimiento máxima para cada una de las cepas estudiadas en condiciones de baja aireación. (*) indica diferencias significativas (Prueba T a 2 colas, $p < 0,05$). Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar ($n=3$).

Síntesis de ácidos orgánicos y etanol en baja aireación

Una vez obtenidos los perfiles de ácidos, la primera conclusión que surge del análisis de los resultados es que la ausencia de cada uno de los reguladores afecta la distribución de carbono entre los metabolitos estudiados con respecto a la cepa control (Figura 16). La cepa Δrob mostró un aumento en la síntesis de los ácidos láctico, fórmico y acético, mientras que también se detectaron aumentos en la síntesis de acetato y lactato en las mutantes $\Delta creC$ y $\Delta arcA$, respectivamente, en comparación con la cepa control (Figura 16). La eliminación de Cra pareció afectar la formación de todos los ácidos. Se observaron incrementos significativos en las cantidades de piruvato (1,6 veces), succinato (2,5 veces) y lactato (1,5 veces) en comparación con la cepa control.

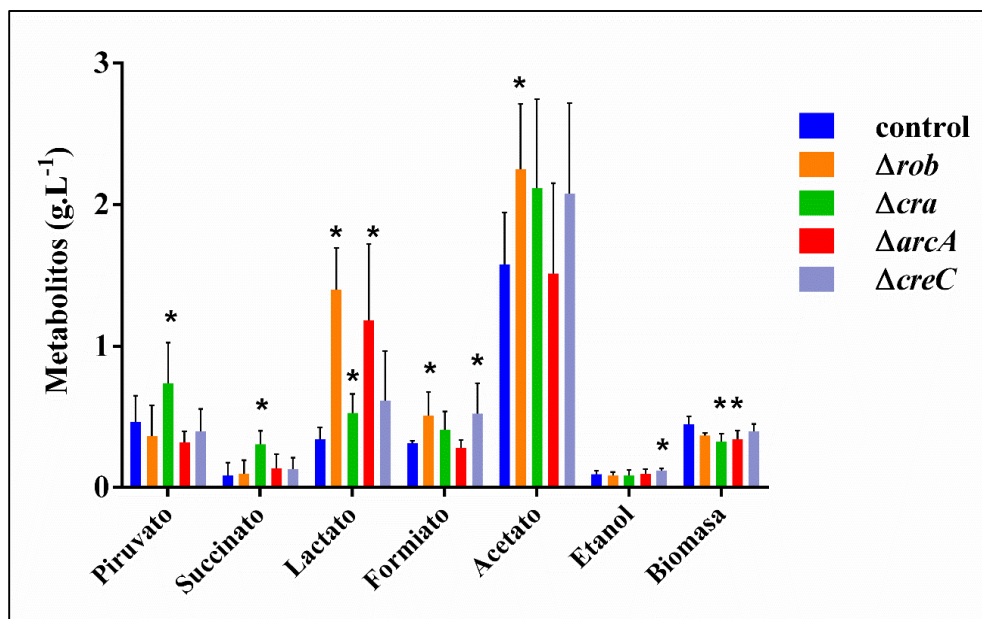


Figura 16. **Perfil de síntesis de metabolitos fermentativos mayoritarios en condiciones de baja aireación.** Todas cepas fueron crecidas utilizando medio M9 y glucosa como fuente de carbono. Las cepas utilizadas fueron la BW25113 (control) y sus mutantes derivadas para cada regulador. (*) indica diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje (Prueba T a 2 colas, $p < 0,05$). Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar ($n=6$).

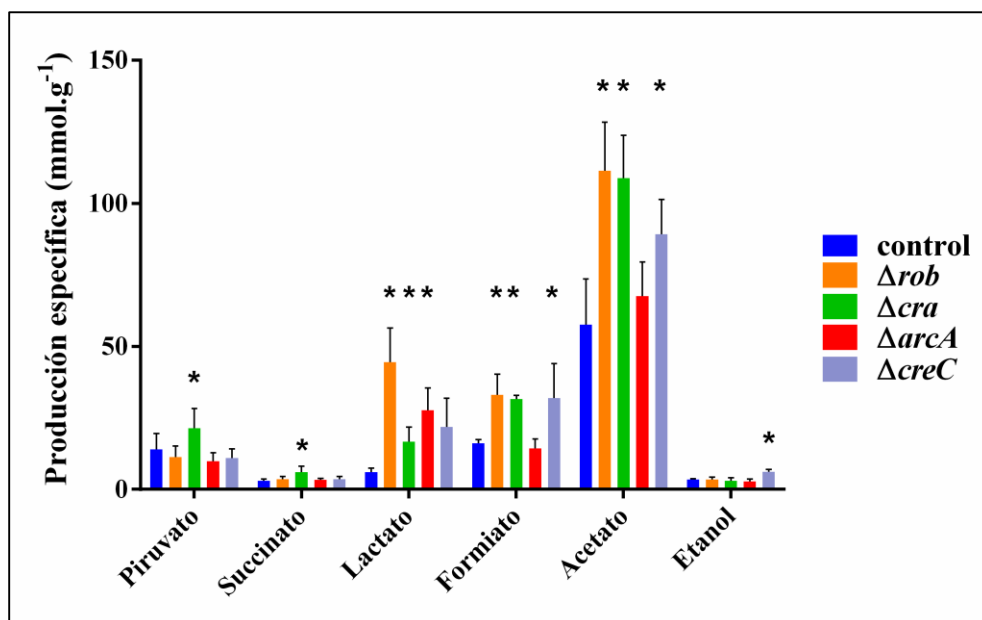


Figura 17. **Producción específica de ácidos orgánicos y EtOH en todas las cepas crecidas en condiciones de baja aireación utilizando medio M9 y glucosa como fuente de carbono.** Las cepas utilizadas fueron la BW25113 (control) y sus mutantes derivadas para cada regulador. (*) indica diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje (Prueba T a 2 colas, $p < 0,05$). Los resultados se expresaron como el valor promedio \pm la desviación estándar ($n=6$).

Las determinaciones de biomasa y síntesis de ácidos sugieren que la distribución de carbono se dirigió hacia la síntesis de metabolitos en mutantes Δcra y principalmente a lactato en el contexto genético generado por la ausencia de ArcA (Figura 16). Esto podría explicarse por un aumento en el flujo de carbono a través de la glucólisis y la represión del ciclo de TCA que se ha informado previamente en mutantes Δcra (Saier 1996), y mediante la canalización de carbono hacia la síntesis de compuestos reducidos en el caso de mutantes $\Delta arcA$ (Ruiz 2012). Este redireccionamiento de carbono explicaría la disminución de biomasa en estas 2 cepas. Cabe destacar que cuando se analizó la producción específica (mmol metabolito/ g peso seco de biomasa), como era de esperar, la mutante Δcra tuvo un aumento aún más marcado para todos los ácidos en cuestión (Figura 14, Figura 17). Por otro lado, medimos la producción de EtOH en condiciones de baja aireación. No se detectaron cambios en la producción de alcohol en los mutantes a excepción de $\Delta creC$, en el que se observó un aumento leve pero significativo en comparación con la cepa control ($0,12 \pm 0,01$ y $0,09 \pm 0,02$ g.L⁻¹, respectivamente) (Figura 16).

Análisis de metabolitos en cepas Δrob y Δcra en cultivos no aireados

Se determinaron además los perfiles metabólicos de cultivos no aireados de los mutantes Δcra y Δrob , ya que la información disponible sobre los efectos de estos reguladores en esta condición es escasa para estas cepas. Mientras que la cepa Δrob tuvo aumentos importantes en la síntesis de lactato, formiato y acetato, acompañada de una modesta disminución de la biomasa cuando fue crecida en condiciones de baja aireación (Figura 16), en cultivos sin aireación esta cepa no mostró diferencias significativas en comparación con la cepa control (Tabla 6). Por el contrario, el aumento en la formación de ácidos observado para la mutante Δcra fue aún más marcado comparado a los cultivos en baja aireación. Los ácidos de fermentación aumentaron en promedio 2 veces, sobre todo para el ácido succínico, de alto interés industrial, llegando a 0,94 g.L⁻¹ mientras que se observó una reducción del 30% en la formación de biomasa para los cultivos no aireados de la cepa Δcra en comparación con la cepa salvaje (Tabla 6). Esto sugiere que el carbono, al igual que se observó en cultivos en baja aireación, se usa para la síntesis de ácidos en lugar de para la producción de biomasa en esta mutante cuando la tensión de oxígeno es limitante.

Finalmente, con respecto a estos resultados podemos decir que la cepa Δcra resultó ser eficiente en la síntesis de succinato, ya que produjo más de 3 veces más que el control en condiciones de baja aireación, llegando a 0,3 g.L⁻¹ mientras que, en cultivos sin aireación, alcanzó casi 1 g.L⁻¹. Esto sugiere

que la manipulación de Cra podría ser útil para la producción de este compuesto en la cepa BW25113.

Cepas	Metabolitos (g.L ⁻¹)						Consumo de glucosa (g.L ⁻¹)
	Piruvato	Succinato	Lactato	Formiato	Acetato	Biomasa	
control	0,03 ± 0,01	0,44 ± 0,08	0,97 ± 0,14	1,2 ± 0,2	0,8 ± 0,1	0,26 ± 0,02	4,4 ± 0,6
Δcra	0,06 ± 0,01*	0,94 ± 0,14*	1,70 ± 0,50*	1,7 ± 0,3*	1,3 ± 0,4*	0,19 ± 0,01*	5,3 ± 0,3
Δrob	0,03 ± 0,01	0,47 ± 0,70	1,00 ± 0,08	1,1 ± 0,4	0,9 ± 0,2	0,22 ± 0,03	4,7 ± 0,3

Tabla 6. Producción de ácidos orgánicos en condiciones no aireadas en medio M9 glucosa 0,5%.

Las cepas utilizadas fueron *E. coli* BW25113 (control) y sus derivados Δ cra y Δ rob. Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de réplicas independientes (n = 6). (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa control (prueba T, p <0,05).

Con el objetivo de dirimir si el aumento en la síntesis de metabolitos para algunas de las cepas se producía por una redistribución de carbono o por un incremento en el consumo de glucosa, se determinó el consumo de sustrato para cada una de las cepas crecidas en distintas condiciones de aireación en medio mínimo con glucosa. No se pudieron apreciar diferencias significativas en ninguna de las condiciones testeadas (Figura 18), confirmando lo que se indicó más arriba, es decir que el carbono se redirecciona hacia los metabolitos de fermentación, sobre todo en las cepas Δ rob, Δ cra y Δ creC.

Estimación de estado redox a través del cociente [etanol]/[acetato]

Finalmente, quisimos examinar si además de lo observado en la distribución de carbono en cada una de las cepas, también se observaban cambios el estado redox general de las células como consecuencia de la delección de los reguladores globales en cuestión. Utilizamos como indicador el cociente EtOH /Acetato (EtOH/Ac).

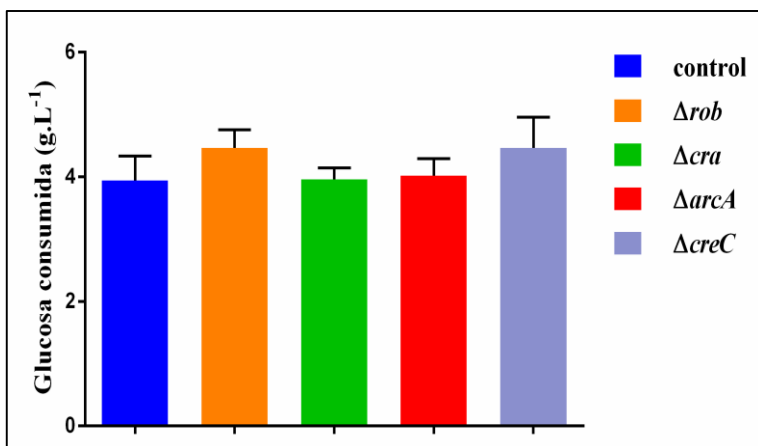


Figura 18. Consumo de glucosa en cultivos en condiciones de baja aireación durante 24 hs.

Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de réplicas independientes ($n = 3$). (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y la cepa control (prueba T, $p < 0,05$).

Como vemos en la Figura 19, la relación de ambos metabolitos, en condiciones de baja aireación, no resultó diferente de la cepa salvaje en ningún caso, salvo para la mutante Δrob . La cantidad secretada de ácido acético por esta mutante resultó ser significativamente mayor que para el control en estas condiciones de cultivo. Por otro lado, la síntesis de EtOH resultó inalterada en esta mutante, lo cual nos lleva a un cociente marcadamente menor. En el caso de la cepa $\Delta arcA$ vimos un aumento de la relación EtOH/Acético, pero resultó no ser significativa. Teniendo en cuenta trabajos previos hubiéramos esperado que fuera mayor, ya que por ejemplo mutantes $\Delta arcA$ de *E. coli* K1060 tienen un estado redox más reducido que el control, con un mayor coeficiente NADH/NAD, y mayores cantidades de EtOH en cultivos microaerobios en medio mínimo (Nikel 2008).

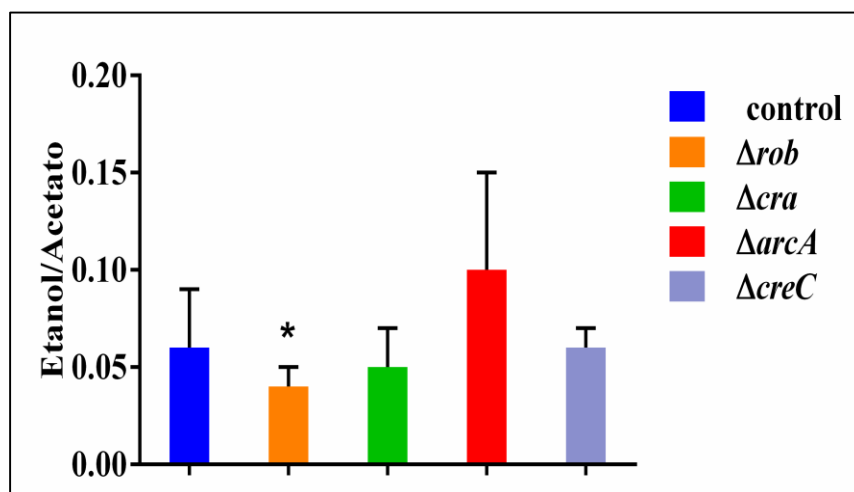


Figura 19. Coeficiente EtOH/Acetato como indicador de estado redox en cultivos en condiciones de baja aireación durante 24 hs.

Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de réplicas independientes ($n = 3$). (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y la cepa control (prueba T, $p < 0,05$).

Ensayos de tolerancia

Por los reportes previos sobre la implicancia de la manipulación de reguladores en la tolerancia de *E. coli* (Okochi 2008) y debido a que la caracterización que realizamos de las cepas en estudio apuntó, en parte, a explorar el potencial biotecnológico de las mismas, nos propusimos estudiar el efecto de la ausencia de los reguladores globales Rob, Cra, ArcA y CreC sobre la respuesta a estrés en la cepa BW25113 en diferentes condiciones de crecimiento utilizando concentraciones subletales de diversos compuestos tóxicos.

Crecimiento en medio sólido M9 y LB con azul de toluidina

Para evaluar el estrés redox se utilizó el colorante azul de Toluidina. Este colorante es responsable del fenotipo Dye en mutantes $\Delta arcA$, por la acumulación excesiva de ERO (Ruiz 2006). Decidimos entonces crecer la cepa salvaje y las cepas carentes de los reguladores mencionados en medio sólido con 0,02 % (m/V) de colorante en placas de Petri. Se utilizaron medio mineral M9 y medio LB con glucosa 0,5%. En ambos casos se incubaron las placas a 37°C durante 24 hs.

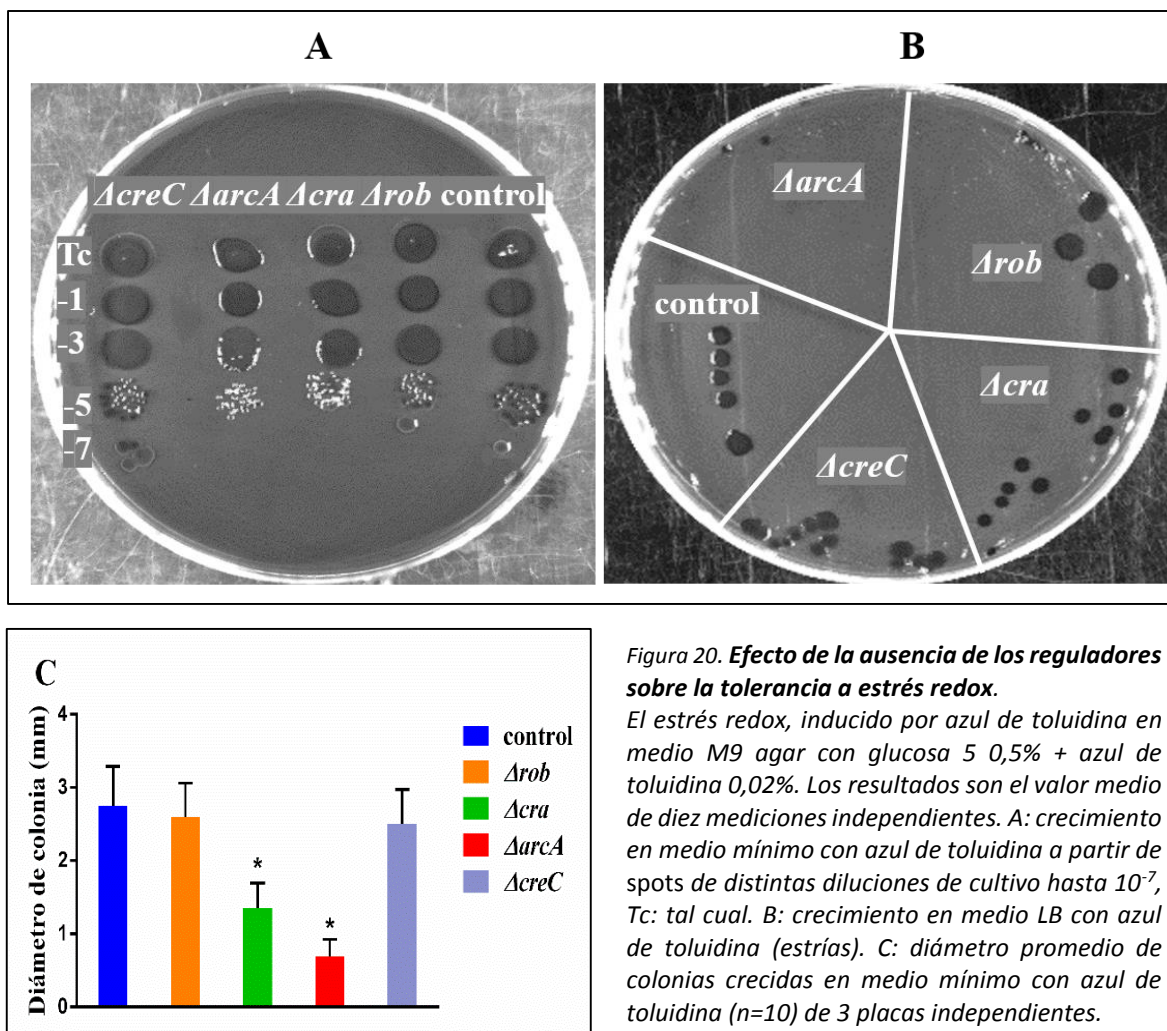


Figura 20. Efecto de la ausencia de los reguladores sobre la tolerancia a estrés redox.

El estrés redox, inducido por azul de toluidina en medio M9 agar con glucosa 5 0,5% + azul de toluidina 0,02%. Los resultados son el valor medio de diez mediciones independientes. A: crecimiento en medio mínimo con azul de toluidina a partir de spots de distintas diluciones de cultivo hasta 10^{-7} , Tc: tal cual. B: crecimiento en medio LB con azul de toluidina (estrias). C: diámetro promedio de colonias crecidas en medio mínimo con azul de toluidina (n=10) de 3 placas independientes.

Los resultados de la Figura 20 muestran una marcada disminución en el diámetro de las colonias de la cepa *ΔarcA* en presencia de azul de toluidina tanto en medio mínimo como complejo, confirmando el conocido fenotipo Dye. Lo mismo se observó para la cepa *Δcra* evidenciando un aumento en la sensibilidad al estrés redox, lo cual va en concordancia con lo informado por Shimada y col. en 2011, donde se determinan varios factores de respuesta a estrés bajo la regulación de Cra. Esto podría indicar una mayor acumulación de ERO por lo mencionado más arriba en mutantes *Δcra*.

Sensibilidad de las cepas a alcoholes en diferentes condiciones de aireación

Luego de la caracterización de la tolerancia a azul de toluidina, se examinó la tolerancia a alcoholes de bajo peso molecular, debido al conocido efecto inhibitorio de estos compuestos en el

crecimiento bacteriano (Nicolaou 2010). Se hizo foco en el estudio de la tolerancia de las cepas en estudio a EtOH, ButOH y PDO.

Tolerancia a etanol

No se vieron diferencias significativas en cuanto a la tolerancia a este compuesto a una concentración de 4,8 % (m/v) en condiciones de alta aireación ni a 4,4% (m/v) en condiciones de baja aireación, salvo para la cepa Δcra (Figura 20). Esta última mostró un incremento de la sensibilidad a EtOH en ambas condiciones de disponibilidad de oxígeno. Dado que el regulón hipotético de Cra incluye numerosos genes relacionados con la respuesta a estrés (Shimada 2011), es posible que este fenotipo se deba a la regulación de estos genes.

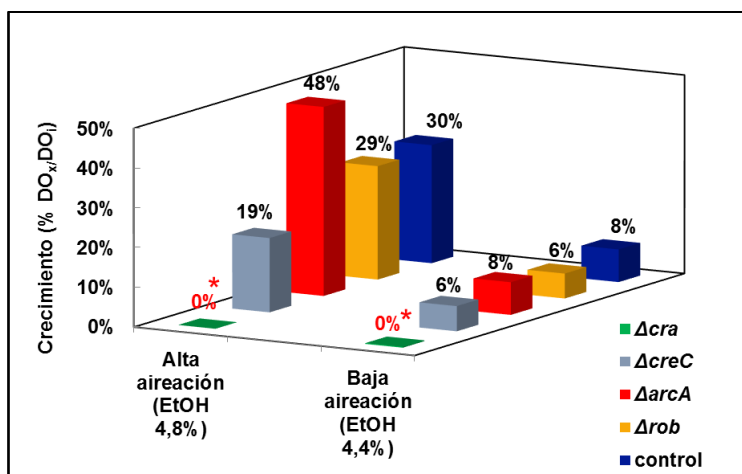


Figura 21. Tolerancia a EtOH en distintas condiciones de aireación.

Todos los valores se expresan como porcentajes de crecimiento bacteriano en presencia de estrés (DO_x) relación con el crecimiento en medio sin agente de estrés (DO_i). Los cultivos se realizaron en frasco agitado M9 suplementado con glucosa 0,5% en condiciones de baja y alta aireación. Las cepas analizadas fueron *E. coli* BW25113 (tipo salvaje) y las mutantes Δrob , Δcra , $\Delta arcA$ y $\Delta creC$. Las células se expusieron a etanol durante 24 horas a 37 ° C. (*)

indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa de tipo salvaje (prueba T, $p < 0,05$). EtOH: etanol. Las concentraciones están expresadas en % m/v.

Tolerancia a 1,3-propanodiol

En el caso de este diol no se hallaron diferencias significativas en cuanto a la tolerancia de las mutantes en condiciones de alta aireación, como se ve en la Figura 22. En condiciones de baja aireación, una vez más se encontró un aumento de la sensibilidad de la cepa Δcra a 7% de PDO. Lo mismo sucedió con la mutante $\Delta creC$, con una disminución muy marcada de la tolerancia a este compuesto. Por el contrario, un interesante incremento, de casi un 50 %, de la tolerancia fue observado en las mutantes $\Delta arcA$, con respecto a la cepa salvaje.

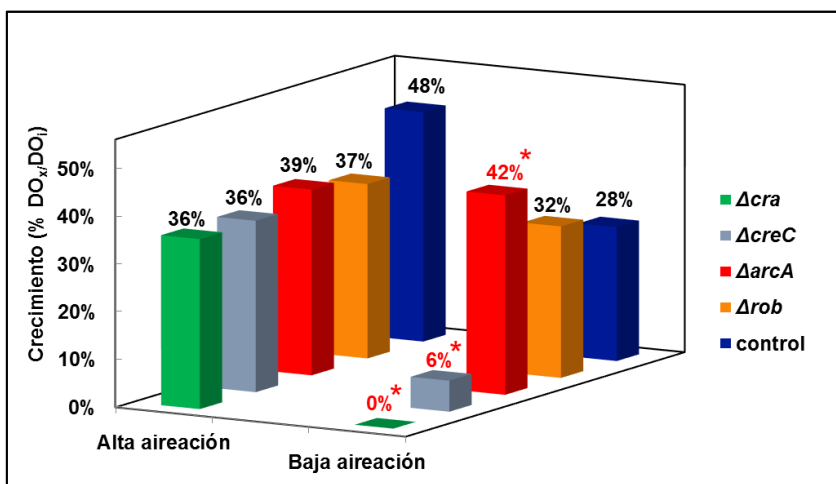


Figura 22. Tolerancia a PDO en distintas condiciones de aireación.

Todos los valores se expresan como porcentajes de crecimiento bacteriano en presencia de estrés (DO_x) relación con el crecimiento en medio sin agente de estrés (DO_i). Los cultivos se realizaron en frasco agitado M9 suplementado con glucosa 0,5% y PDO 7% en condiciones de baja y alta aireación. Las cepas

analizadas fueron *E. coli* BW25113 (control) y las mutantes Δrob , Δcra , $\Delta arcA$ y $\Delta creC$. Los resultados representan el valor medio \pm la desviación estándar. Las células se expusieron a etanol durante 24 horas a 37 °C. (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa de tipo salvaje (prueba T, $p < 0,05$).

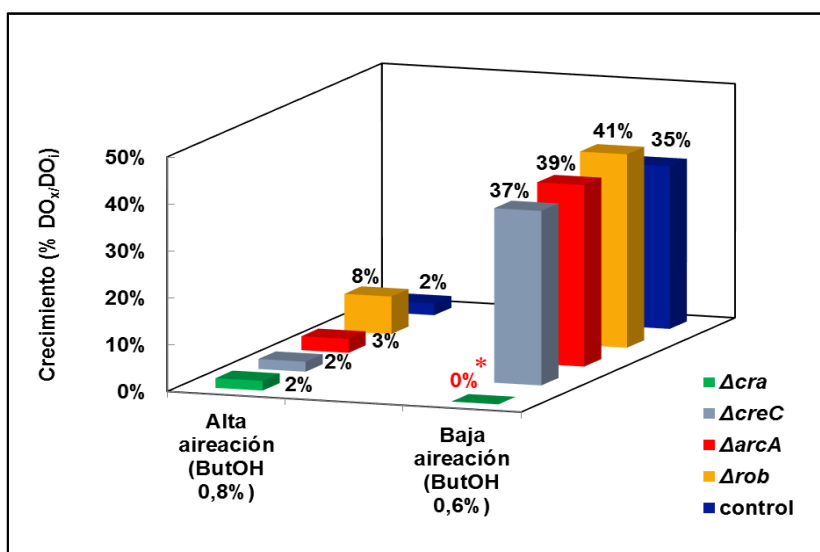


Figura 23. Tolerancia a butanol en distintas condiciones de aireación.

Todos los valores se expresan como porcentajes de crecimiento bacteriano en presencia de estrés (DO_x) relación con el crecimiento en medio sin agente de estrés (DO_i). Los cultivos se realizaron en frasco agitado M9 suplementado con glucosa 0,5% en condiciones de baja y alta aireación. Las cepas analizadas fueron *E. coli* BW25113 (control) y las mutantes Δrob , Δcra , $\Delta arcA$ y $\Delta creC$. Los resultados

representan el valor medio ($n=6$). Las células se expusieron a butanol durante 24 horas a 37 °C. (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa de tipo salvaje (prueba T, $p < 0,05$).

Tolerancia a n-butanol

En la Figura 23 podemos observar como la mutante Δcra es la que presenta un fenotipo mucho más sensible a ButOH ya que inhibe su crecimiento en concentraciones de 0,6 % (m/v) mientras que la cepa control logra crecer un 35% con respecto al crecimiento en ausencia de ButOH, en cultivos en baja aireación. Como se vio para todos los compuestos de tipo alcohol, la mutante Δcra resulta ser significativamente más sensible. Sin embargo, al igual que el resto de las cepas, la mutante Δcra no

exhibió aumentos en la sensibilidad a este compuesto cuando fue crecida en condiciones no restrictivas de O₂ en 0,8 % de ButOH. Por último, en condiciones de alta aireación, la cepa Δrob mostró un ligero incremento en la tolerancia, aunque el mismo resultó ser estadísticamente no significativo.

Estrés inducido por NaCl y tetraciclina

El estrés osmótico inducido por cloruro de sodio es un factor importante a tener en cuenta ya que esta sal está presente en casi todos los medios de cultivos y es un factor clave que debe ajustarse en los bioprocesos. Puede mencionarse que la cepa $\Delta arcA$ muestra un crecimiento ligeramente menor en 3,5 % de NaCl en condiciones de alta aireación (Figura 24). Por su parte, la cepa $\Delta creC$ parece mostrar una tendencia de mayor crecimiento en ambas condiciones, aunque la misma no resultó significativa. Esto muestra que la delección de estos reguladores no afecta demasiado la tolerancia a estrés osmótico, un factor muy importante en las condiciones de cultivo típicas de los procesos de producción biotecnológicos. Esto resulta beneficioso teniendo en cuenta la potencial ventaja de utilizar los contextos genéticos generados mediante la delección de los reguladores en la síntesis de compuestos de interés industrial.

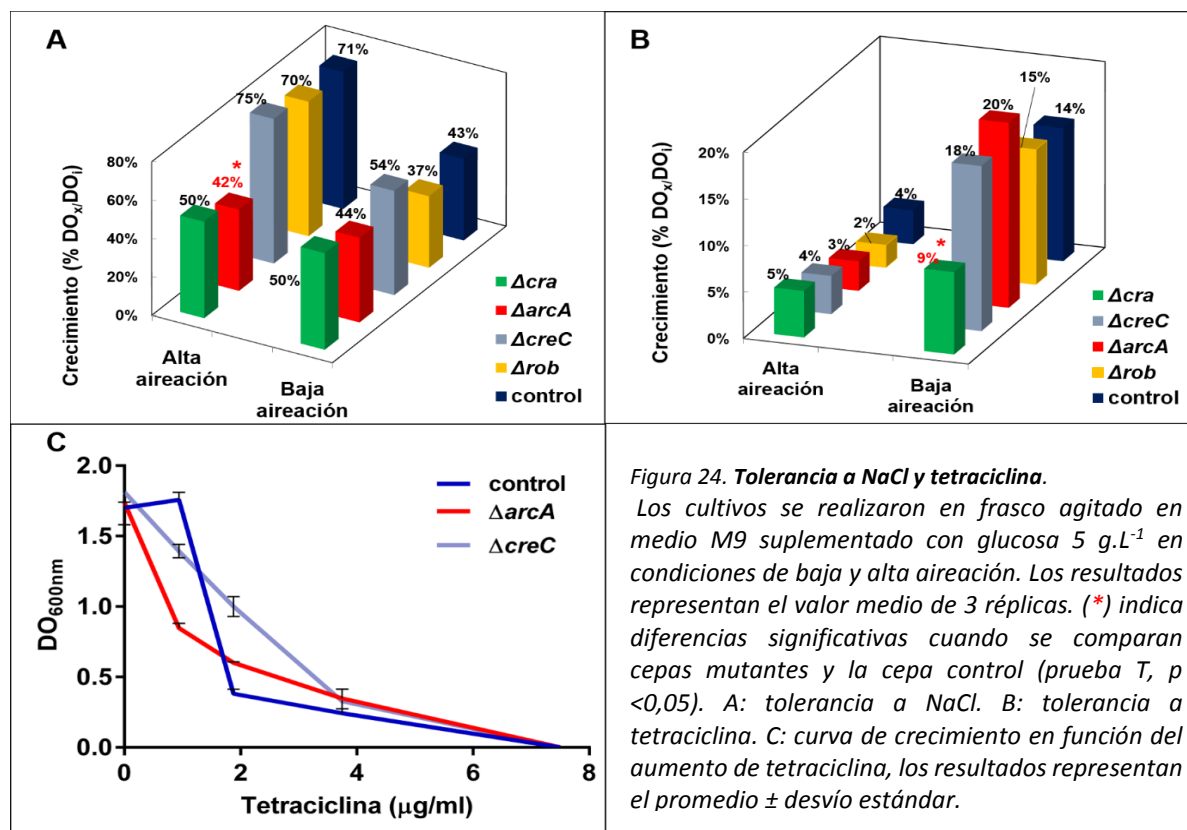


Figura 24. Tolerancia a NaCl y tetraciclina.

Los cultivos se realizaron en frasco agitado en medio M9 suplementado con glucosa 5 g.L⁻¹ en condiciones de baja y alta aireación. Los resultados representan el valor medio de 3 réplicas. (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y la cepa control (prueba T, $p < 0,05$). A: tolerancia a NaCl. B: tolerancia a tetraciclina. C: curva de crecimiento en función del aumento de tetraciclina, los resultados representan el promedio \pm desvío estándar.

En cuanto a la sensibilidad a antibióticos, no se observaron diferencias significativas en alta aireación para ninguna mutante. En baja aireación, sin embargo, la cepa $\Delta arcA$ incrementó levemente su tolerancia a tetraciclina (Tet) en una concentración de 3,75 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y una vez más se observó un aumento en la sensibilidad para la mutante Δcra . Además, como se ve en la Figura 24C, las cepas $\Delta creC$ y $\Delta arcA$ disminuyen más lentamente su crecimiento a medida que se incrementa la concentración de Tet alcanzando densidades ópticas mayores en 1,88 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Efecto de la sobreexpresión de Rob sobre la tolerancia a alcoholes

El regulador global Rob comparte el control de parte de su regulón con los factores de transcripción MarA y SoxS (Martin y Rosner 2003). Se ha demostrado que la sobreexpresión de Rob confiere mayor tolerancia a solventes orgánicos y otros compuestos (Nakajima 1995, White 1997). Por esto nos propusimos investigar el efecto de la sobreexpresión de Rob en la cepa control en relación a la tolerancia a alcoholes, ya que esto podría constituir una ventaja en los procesos de síntesis de los mismos. Para ellos utilizamos el plásmido pSRob (White 1997) y el plásmido pBRob (Figura 25), construido en el laboratorio a partir del primero, que contienen el gen *rob* bajo un promotor inducible por IPTG.

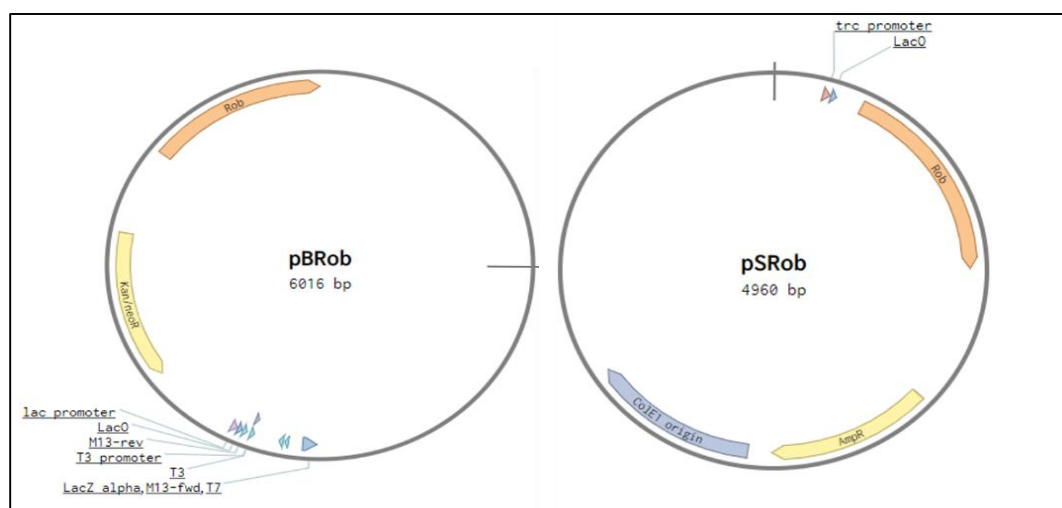


Figura 25. Plásmidos utilizados para la sobreexpresión de Rob.

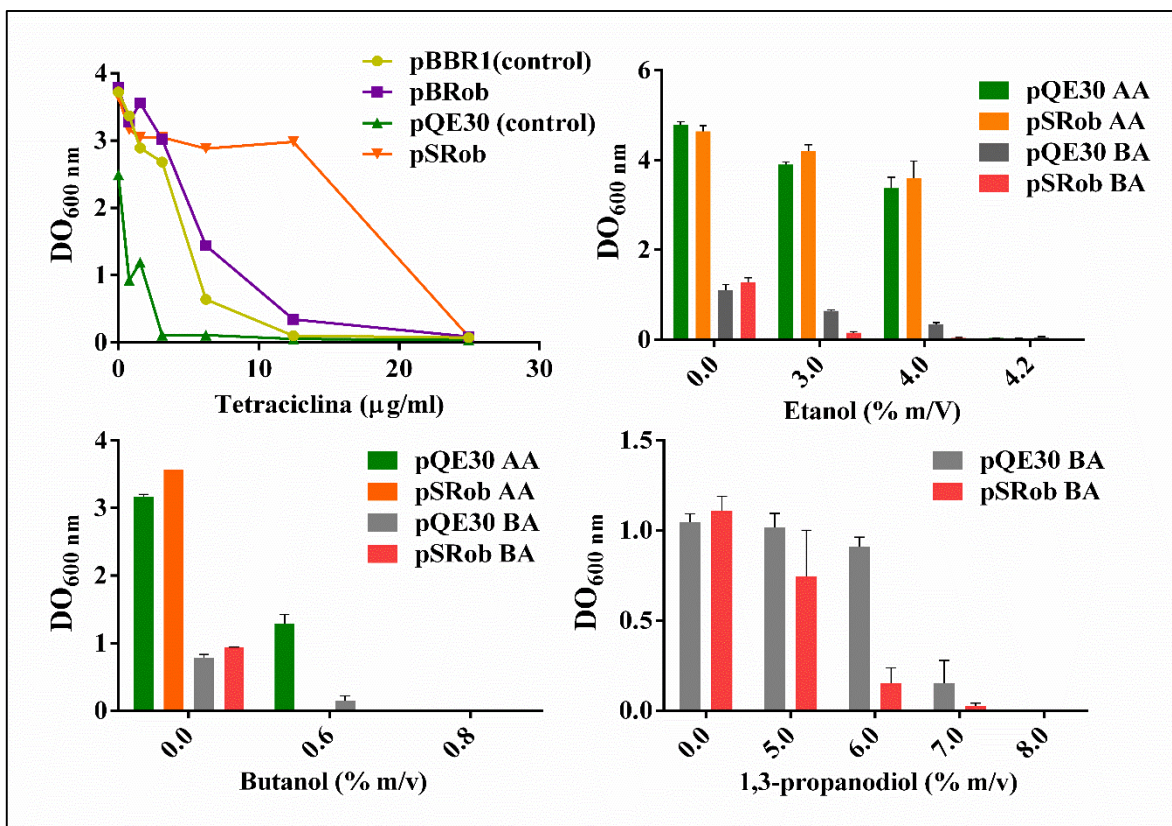


Figura 26. Efecto de la sobreexpresión de rob tolerancia a solventes.

Todos los valores se expresan como densidad óptica bacteriana medida a 600 nm. Los cultivos se realizaron en frasco agitado en medio M9 suplementado con glucosa 0,5 % en condiciones de baja y alta aireación. Las cepas analizadas fueron *E. coli* BW25113 (tipo salvaje) transformada con los plásmidos pQE30 o pBBR1 (controles) y pSRob o pBRob. como plásmidos de expresión. La inducción del gen se produjo en fase exponencial temprana ($DO=0,8$). Los resultados representan el valor medio \pm el desvío estándar. Las células se expusieron a A: tetraciclina, B: etanol, C: 1,3-propanodiol y D: butanol, durante 24 horas a 37 °C en diferentes condiciones de aireación. AA: alta aireación. BA: baja aireación.

En primer lugar, para chequear la eficiencia de los sistemas de expresión estudiamos su efecto en la tolerancia a Tet ya que se ha descrito que Rob aumenta la tolerancia a antibióticos (Nakajima 1995). Como se ve en la Figura 26 A, el sistema que mejor funcionó fue el pSRob, logrando aumentar notablemente la tolerancia de la cepa BW25113 salvaje, que creció en 12,5 µg/ml de Tet mientras que la cepa control dejó de crecer con apenas 3,12 µg/ml del antibiótico.

Debido a los mejores resultados obtenidos utilizando el plásmido pSRob continuamos utilizándolo en los experimentos para determinar el efecto de este regulador sobre la tolerancia a alcoholes. Sin embargo, cuando analizamos la tolerancia de la cepa a EtOH, ButOH y PDO, no detectamos ninguna diferencia con respecto a la cepa salvaje transformada con un plásmido vacío como control (Figura 26B, C y D). De hecho, la expresión de *rob* inducida por IPTG pareció ser perjudicial para el crecimiento, probablemente por el uso de recursos celulares, propio de la sobreexpresión del gen y

la replicación del plásmido. Por lo visto aquí y en los trabajos previos mencionados, es posible que el efecto potenciador en la tolerancia, conferida por este regulador, esté limitado a compuestos de menor polaridad como el hexano y ciclohexano.

Búsqueda de patrones fenotípicos por análisis de componentes principales

Los fenotipos de cada mutante, como hemos visto en las secciones anteriores, varían dependiendo de los parámetros medidos y las condiciones de disponibilidad de oxígeno.

En esta última sección se buscaron patrones característicos que pudieran caracterizar el efecto de cada mutación. Se debe tener en cuenta la extensa red de regulación que es inherente a cada regulador global estudiado, sumado al hecho de que muchos genes son regulados en forma simultánea por más de un regulador global (Martínez-Antonio y Valle-Collado 2003, Perrenoud 2005, Shimizu 2015). Por estas razones, la identificación de un patrón fenotípico propio de cada mutación no resulta ser una cuestión trivial.

Patrones en la síntesis de metabolitos

En una primera etapa y siguiendo la línea de los estudios previos, analizamos el comportamiento de las cepas mutantes teniendo en cuenta cada uno de los ácidos y el EtOH producidos en condiciones de baja aireación.

Como podemos ver en la Figura 27 (que deriva de los datos mostrados previamente en la Figura 16), cada mutación afecta claramente la distribución de carbono en comparación con la cepa salvaje. Un ACP no supervisado para poder estudiar las tendencias de cada cepa nos muestra que todas las mutantes se diferencian claramente de la cepa salvaje, si bien algunas de las mutantes tienen una amplia dispersión, como en el caso de las cepas Δrob y $\Delta creC$. Por último, podemos ver que Δcra , además de distanciarse de la cepa control, también presenta una distancia significativa del resto de las mutantes, formando un grupo definido. Teniendo en cuenta que las primeras dos componentes principales explican más del 60% de la variabilidad total, la estadística multivariada nos da idea certera del patrón de efectos producidos por la manipulación de los reguladores globales estudiados, siendo la mutante Δcra la más diferenciada de la cepa salvaje, lo cual también se podía apreciar en la mayoría de los ensayos de producción de metabolitos en diferentes condiciones de aireación. Si bien la mutante Δrob mostró diferencias significativas en los ensayos en baja aireación, en condiciones sin O_2 estas diferencias desaparecieron siendo su perfil

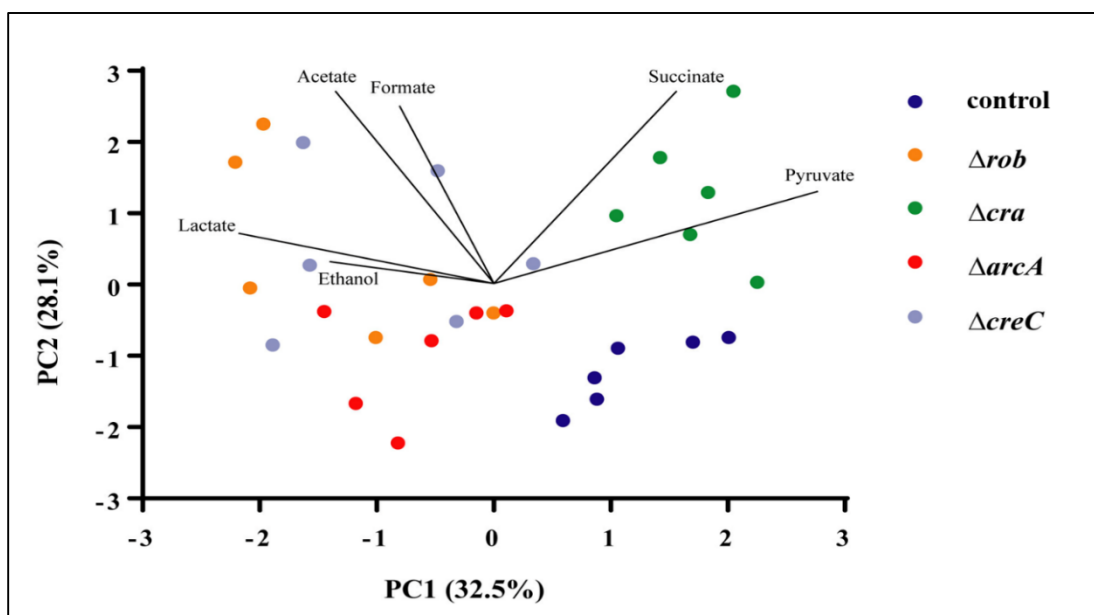


Figura 27. **Análisis de componentes principales de los perfiles metabólicos.**

El análisis de componentes principales no supervisado se aplicó al perfil de ácidos orgánicos de todas las cepas utilizando concentraciones de metabolitos relativizadas a la biomasa final (metabolito g. g CDW-1). Las variables originales se muestran en el gráfico y se utilizaron valores de triplicados de al menos dos experimentos independientes ($n = 6$).

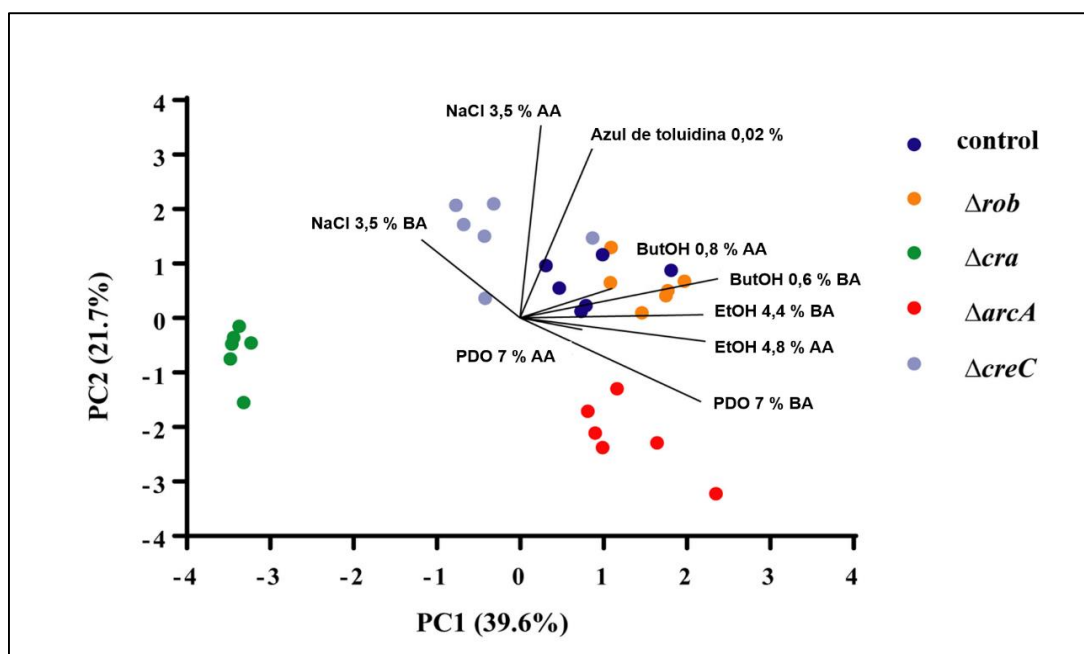


Figura 28. **ACP de la tolerancia de las cepas a las diferentes condiciones de estrés.**

Se aplicó el análisis de componentes principales sin supervisión a la respuesta de todas las cepas a diferentes agentes de estrés. Las variables originales se muestran en el gráfico y se utilizaron valores de triplicados de al menos dos experimentos independientes ($n = 6$). AA: alta aireación. BA: baja aireación. Las concentraciones de agentes de estrés se expresan en (% m/V). EtOH: etanol. ButOH: butanol. PDO: 1,3-propanodiol.

metabólico muy similar al de la cepa salvaje. Esto explica la gran dispersión de las réplicas de esta cepa en el análisis de componentes principales. Finalmente, se puede mencionar que, aunque los resultados entre las cepas Δrob , $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ fueron dispares considerando cada parámetro en forma individual, la estadística multivariada nos indica que su distribución es similar, superponiéndose parcialmente.

Análisis por estadística multivariada de los estudios de tolerancia

El ACP, incluidos todos los resultados de tolerancia, mostró que la mutante Δcra , que era extremadamente sensible a muchos de los compuestos probados, especialmente en condiciones de baja aireación, estaba claramente separada del resto con la distancia máxima, seguida por la cepa $\Delta arcA$, mientras que la distribución de las cepas Δrob y $\Delta creC$ está parcialmente solapada con la cepa de tipo salvaje. Las componentes principales 1 y 2 explicaron el 61% de la varianza total en este análisis (Figura 28). La mayor sensibilidad de la cepa Δcra podría explicarse por los cambios en la respuesta al estrés, ya que varios reguladores de la respuesta al estrés se han identificado como probables blancos de Cra, como ya se mencionó en este capítulo (Shimada 2011).

La mayor sensibilidad al azul de toluidina observada para los mutantes Δcra en este estudio podría ser un indicador de estrés redox. Este efecto en la sensibilidad en general se pone de manifiesto en el análisis multivariado. En cuanto a la cepa $\Delta arcA$, si bien no tuvo grandes diferencias en cuanto al aumento en la sensibilidad a algún compuesto con respecto a la cepa salvaje, sí exhibió aumentos significativos en la tolerancia a PDO y esto es suficiente para que el ACP nos muestre una distribución alejada del control. El solapamiento del resto de las cepas con el control mostró que algunas de las diferencias halladas a lo largo de los ensayos de tolerancia no resultan ser significativas cuando se tienen en cuenta todos los experimentos simultáneamente.

Efecto de la aireación sobre la tolerancia de las cepas mutantes

Debido a que la tolerancia a compuestos tóxicos está estrechamente ligada a la generación de energía por parte de las células, debido al uso de ATP de las bombas de eflujo de membrana (Nicolau 2010), nos propusimos evaluar a través de la estadística multivariada el efecto de las mutaciones sobre la tolerancia general a los compuestos probados en cada una de las condiciones de aireación ensayadas. De esta forma, intentamos ver si los patrones hallados en el ACP anterior se mantenían teniendo en cuenta el factor aireación. En condiciones de alta aireación, como se ve

en la Figura 29A, se ve el mismo patrón que se observó en las ACP en función de todos los parámetros de tolerancia. Las mutantes Δcra y $\Delta arcA$ se encuentran separadas claramente de la cepa control y entre sí, mientras que la cepa salvaje solapa en gran medida con la distribución de Δrob y $\Delta creC$. Esta última tiene una gran dispersión entre las componentes 1 y 2, las cuales explican más del 60% de la variabilidad.

Por su parte, el ACP para los ensayos realizados en baja aireación, los grupos más diferenciados fueron las mutantes Δcra y $\Delta creC$ y en menor medida la cepa $\Delta arcA$ (Figura 29B). La distancia que exhibió la mutante $\Delta creC$ puede explicarse teniendo en cuenta los resultados de los ensayos de tolerancia a PDO sobre todo en baja aireación. La mayor sensibilidad en condiciones de baja disponibilidad de O_2 podría estar relacionada con la disminución en la generación de energía durante el crecimiento bacteriano. Por su parte, el patrón de la mutante Δcra es consistente en ambas condiciones y puede deberse a una menor generación de energía, ya que estas mutantes presentan una disminución de la actividad del ciclo de Krebs donde se produce la mayor parte del ATP y el poder reductor, como a genes relacionados con la respuesta a estrés regulados por Cra. Finalmente, la mutante $\Delta arcA$ presentó menos diferencias en baja aireación, lo cual puede deberse a que estas mutantes presentan un aumento considerable del flujo de carbono en el ciclo de Krebs en estas condiciones (Nizam 2008).

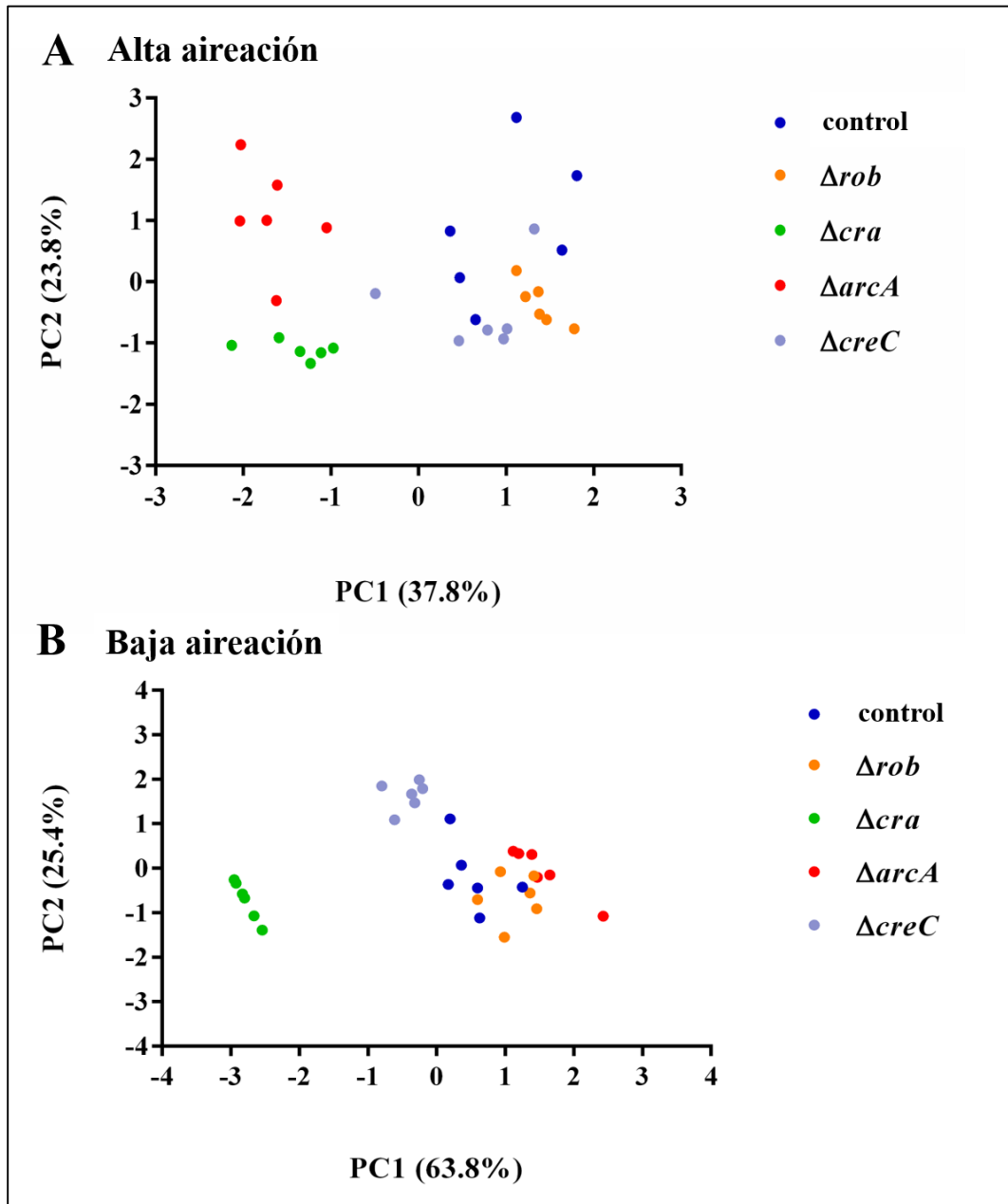


Figura 29. Distribución de las mutantes en función de la tolerancia estrés en diferentes condiciones de disponibilidad de O₂.

Se aplicó el análisis de componentes principales sin supervisión a la respuesta de todas las cepas a diferentes agentes de estrés en función de la disponibilidad de oxígeno. Se utilizaron valores de triplicados de al menos dos experimentos independientes ($n = 6$).

Patrones en la respuesta metabólica y fisiológica de las diferentes mutantes

Finalmente, se analizaron al mismo tiempo estos 2 grandes grupos de variables (crecimiento y producción de metabolitos por un lado y respuesta a la tolerancia a compuestos tóxicos por otro).

Los componentes principales del ACP obtenido interpretaron más del 50% de la varianza. En este caso, se pueden apreciar 5 grupos bien definidos (Figura 30) sin solapamiento significativo. En este caso, la máxima distancia en comparación con la cepa salvaje correspondió a la mutante Δcra , mientras que las otras 4 se agruparon con relativa cercanía entre ellas. En términos generales, el fenotipo más diferenciable y particular resulta, hasta aquí, ser el generado por la ausencia del regulador global Cra, que se diferencia claramente de todas las cepas mutantes y de la cepa control, aunque cabe destacar que en este análisis todas las cepas presentaron una distribución más o menos definida, lo cual es útil para aproximarnos a la búsqueda de un patrón propio para caracterizar el efecto de la mutación de cada regulador.

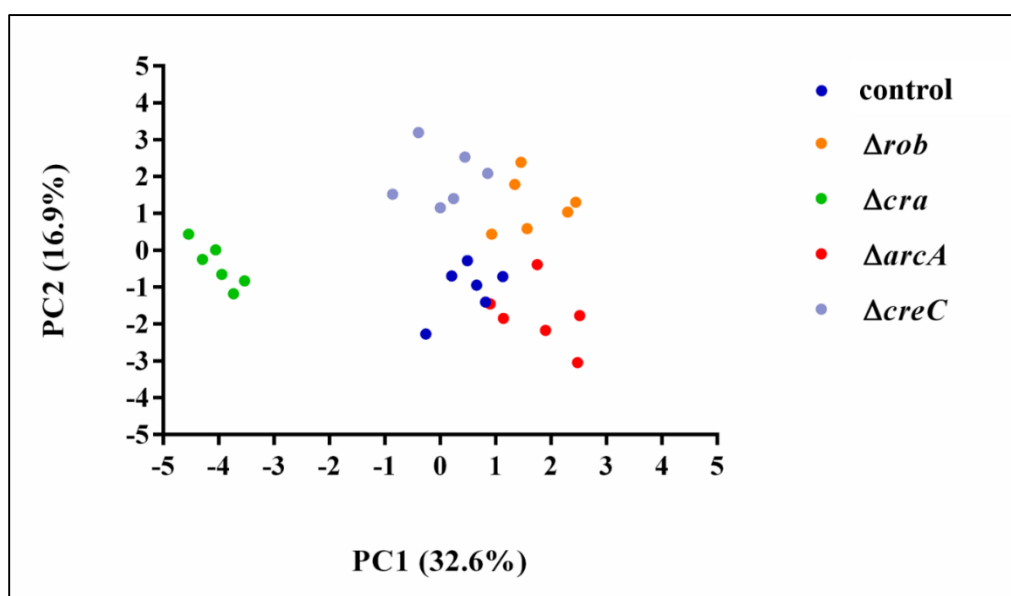


Figura 30. **Análisis multivariado del efecto metabólico y fisiológico de la ausencia de los reguladores globales.** Se aplicó el análisis de componentes principales sin supervisión a la respuesta de todas las cepas a diferentes agentes de estrés y al perfil metabólico en condiciones de baja aireación. Se utilizaron valores de triplicados de al menos dos experimentos independientes ($n = 6$).

Discusión y conclusiones parciales

Perfiles metabólicos

Durante esta primera etapa de caracterización del efecto de la ausencia de los reguladores globales Rob, Cra, ArcA y CreC, obtuvimos los perfiles metabólicos de cada cepa en condiciones de baja disponibilidad de O_2 con el objetivo de evaluar la distribución de carbono dentro de la célula. Teniendo en cuenta la síntesis de ácidos orgánicos y EtOH, los principales metabolitos de

fermentación. En el caso del EtOH, *ΔcreC* fue la única mutante que mostró un fenotipo diferente al control, produciendo el doble de este alcohol y un aumento notable en formiato y la mutante *ΔarcA*, produjo mayores cantidades de láctico. Las mutantes *Δrob* y *Δcra* tuvieron los efectos más pronunciados, mostrando aumento en la síntesis de varios ácidos. La cepa *Δrob* mostró incrementos notables en los ácidos láctico, fórmico y acético. En cuanto a la mutante *Δcra*, la síntesis de todos los ácidos aumentó en promedio al doble, comparado con la bacteria salvaje. Cabe destacar que la síntesis de succinato en esta cepa fue más de 3 veces superior al control, llegando a 0,30 g.L⁻¹.

Cuando estudiamos los perfiles metabólicos de las cepas *Δrob* y *Δcra* en cultivos sin aireación, la síntesis de ácidos en la mutante *cra* fue, de al menos, el doble de concentración para todos los ácidos en comparación con la cepa salvaje. En cuanto al ácido succínico, de particular importancia por sus aplicaciones industriales, produjo 0,94 g.L⁻¹, mientras que la cepa control alcanzó 0,4 g.L⁻¹. Llamativamente y recordando el perfil metabólico en condiciones de baja aireación, la cepa *Δrob* no mostró diferencias con respecto a la cepa salvaje. Evidentemente, el efecto de la mutación de Rob depende, en gran manera, de la disponibilidad de O₂. Dada la escasa información disponible acerca de este regulador, no es posible establecer una hipótesis en cuanto a qué pasos metabólicos específicos serían los responsables de los cambios observados, pero los resultados sugieren que el efecto de este regulador varía según las condiciones de disponibilidad de O₂, tal como se ha visto para otros reguladores.

En las mutantes *Δcra* el aumento de síntesis de metabolitos y la reducción de la biomasa (en comparación al control) podría explicarse por el efecto de la ausencia del regulador, que causa un aumento del flujo de carbono en la glucólisis y la represión del ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato (Saier y Ramseier 1996, Chin 1987, Yao 2013).

El aumento de lactato en *ΔarcA* y de fórmico en *ΔcreC* habían sido observados ya en la cepa K1060 (Nikel 2008 y Godoy 2016, respectivamente). Por el contrario, el aumento de EtOH en *ΔcreC* no pudo observarse en la cepa K1060.

Con toda esta información, podemos concluir que la manipulación de los reguladores globales en todos los casos altera la distribución de carbono intracelular, el cual parece ser redirigido hacia la síntesis de metabolitos. Esto queda de manifiesto, sobre todo, en las cepas *Δcra* y *ΔarcA*, ya que además exhiben menor formación de biomasa en cultivos en frasco agitado a 24 hs, en diferentes condiciones de aireación en medio mínimo con glucosa. Por último, el consumo de sustrato, que fue similar en todas las cepas, reafirma el hecho de que el carbono está siendo redistribuido hacia metabolitos fermentativos.

Efectos cepa-dependientes

La comparación con los resultados informados en estudios previos mostró que, si bien los obtenidos usando las mismas cepas eran consistentes, como la producción de ácidos orgánicos en los mutantes Δcra (Yao 2013), los resultados obtenidos con otras cepas diferentes de la BW25113 variaban. Por ejemplo, el aumento en la formación de ácidos orgánicos en los mutantes $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ en este trabajo también se observó en cepas derivadas de *E. coli* K1060 que contienen delecciones en los mismos reguladores (Ruiz 2012, Godoy 2016) pero se encontraron resultados contrastantes cuando se compararon los resultados en la síntesis de EtOH. Mientras que mutantes $\Delta creC$ de BW25113 mostraron mayores cantidades de EtOH que el tipo salvaje, el EtOH producido por mutantes $\Delta creC$ de la cepa K1060 y la cepa control no eran diferentes (Godoy 2016). Se observó lo contrario cuando se analizaron las mutantes $\Delta arcA$, ya que mientras que la cepa K1060 tenía una producción incrementada de EtOH (Nikel 2008), no se observaron diferencias para la cepa de la colección Keio (BW25113) en el presente estudio.

Estas observaciones sugieren la existencia de efectos cepa-dependientes, donde la consecuencia de la alteración de la regulación genética se ve afectado por el contexto genético donde dicha alteración se realiza. Esto pone de manifiesto la importancia de utilizar cepas con un genoma secuenciado en su totalidad y bien caracterizado. En los ejemplos mencionados en el párrafo anterior, la cepa utilizada fue la K1060 cuyo genoma no está secuenciado. Esto impedía extrapolar los resultados a un nivel más general, debido a la incertidumbre con respecto a mutaciones que pudieran estar presentes en esta cepa y que pudieran interferir con el efecto de las mutaciones en los genes de reguladores globales. De esta manera, al trabajar con la cepa BW25113 que no tiene alteraciones genéticas adicionales es posible caracterizar de manera más acertada mutaciones en genes que codifican para este tipo de reguladores con múltiples genes diana y, en consecuencia, conocer las funciones de los mismos sobre el metabolismo bacteriano.

Tolerancia

Para continuar con la caracterización fisiológica de las mutantes, realizamos ensayos de tolerancia en diferentes condiciones de aireación. Estos ensayos tuvieron dos objetivos: por un lado, completar la caracterización de los efectos de los reguladores, y por el otro evaluar el desempeño que las cepas podrían tener en procesos biotecnológicos en relación a la tolerancia a estrés. No hubo grandes cambios con respecto a la cepa salvaje, excepto para la mutante Δcra . Esta mutante resultó

ser más sensible a casi todas las condiciones ensayadas y, en particular, llamó nuestra atención su fenotipo sensible en medio sólido con azul de toluidina, similar al Dye de mutantes $\Delta arcA$. Esto concuerda con el hecho de que varios de los blancos potenciales de Cra son factores de respuesta a estrés (Shimada 2011). Además, se ha observado una disminución de la expresión del operón *bet*, responsable de la homeostasis osmótica, en los mutantes Δcra de la cepa JM109, lo cual afecta significativamente el crecimiento de la bacteria (Son 2011), y podría explicar en parte la mayor sensibilidad observada.

Por su parte, $\Delta arcA$ no mostró diferencias significativas bajo condiciones de estrés, salvo para el azul de toluidina, como se esperaba. Podemos destacar un aumento en la tolerancia a PDO en cultivos realizados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, donde la cepa $\Delta arcA$ logró crecer un 50 % más comparado con el control. En cuanto a $\Delta creC$, no tuvo grandes diferencias con respecto al control, salvo una marcada disminución en la tolerancia a PDO en baja aireación. Vale la pena mencionar que en la cepa K1060 si se pudo detectar una sensibilidad marcada a azul de toluidina en medio mínimo en mutantes del gen *creC* (Godoy 2014). Una vez más, parece haber efectos dependientes del contexto genético utilizado.

Por último, examinamos el efecto de la manipulación de Δrob tanto por su delección como por la sobreexpresión del gen. En ambas estrategias, no pudimos evidenciar diferencias con la cepa parental. Se sabe, como se dijo en la introducción, que los niveles endógenos de Rob proporcionan una moderada tolerancia a solventes orgánicos por lo cual, la similitud en la tolerancia a los diferentes compuestos observados para la mutante Δrob podría deberse a las características del regulón MarA / SoxS / Rob. Estos reguladores comparten el control de muchos genes relacionados con el estrés (Martin y Rosner 2002), por lo que es posible que la ausencia de Rob pueda ser compensada por la actividad redundante de MarA o SoxS. En cuanto a la sobreexpresión, la falta de diferencias podría explicarse en base al tipo de compuestos contra los cuales Rob proporciona un efecto protector. Se sabe que cepas donde se aumentó la concentración de Rob, resultaron más resistentes a la presencia de solventes orgánicos como el hexano y el ciclohexano (Levy 1997). Es posible que este efecto esté limitado a compuestos no polares y no incluya a alcoholes de cadena corta y de mayor polaridad, como los que estudiamos en nuestros ensayos.

Análisis multivariado

Por último, y con el afán de dilucidar posibles patrones particulares asociados con cada mutación, implementamos análisis multivariados teniendo en cuenta grupos de variables. Así, pudimos ver

que la distribución de la mutante *Δcra* fue la que más se distanció de la cepa salvaje y del resto de las mutantes cuando teníamos en cuenta los perfiles metabólicos.

En los ensayos de tolerancia una vez más esta cepa y la mutante *ΔarcA* presentaron la mayor distancia en la distribución. Cuando realizamos el análisis teniendo en cuenta la condición de aireación, vimos como el patrón de distribución de puntos resultaba ser diferente. Esto es relevante ya que nos permite tener una idea de las condiciones óptimas para el diseño de potenciales bioprocesos, además de permitirnos observar cómo la generación de energía (que depende, en gran parte, del tipo de metabolismo en función de los aceptores de electrones disponibles) altera el efecto de las manipulaciones en los reguladores.

Finalmente, al tener en consideración todas las variables estudiadas en su conjunto, pudimos ver como cada cepa tiende a formar grupos discretos casi sin solapamiento, mostrando a las mutantes *Δcra* y *ΔarcA*, como los grupos más diferenciados de la cepa control. Esto nos indica que el efecto de cada regulador podría ser individualizado más allá de la extensa red de regulación de cada uno, muchas veces con nodos en común (Perrenoud 2005, Shimizu 2013).

Capítulo II

CAPITULO II. Identificación de contextos genéticos adecuados para la síntesis de compuestos biotecnológicos

Prefacio

Tras el análisis de los perfiles de metabolitos y la tolerancia de las mutantes para reguladores globales a diferentes tipos de estrés, se estudió a continuación el efecto de cada delección en varias cepas que contienen genes heterólogos que aumentan la síntesis de EtOH o permiten la producción de PHB y PDO, ambos compuestos no nativos en *E. coli*. Nuestra hipótesis apuntó a que las distintas mutaciones provocan una redirección del carbono hacia los principales metabolitos fermentativos. Por lo tanto, es posible que el contexto genético causado por la delección de un regulador pueda resultar propicio para la producción de estos compuestos de interés biotecnológico. En esta etapa del trabajo se analizó además la utilización del glicerol, el subproducto principal de la producción de biodiesel y, por lo tanto, un sustrato barato y fácilmente disponible (Sun 2018).

La producción de EtOH se determinó en todas las cepas mutantes transformadas con un plásmido que contiene el gen *adhE* de *Leuconostoc mesenteroides*, y los cultivos se llevaron a cabo en condiciones de baja aireación en LB suplementado con glucosa o glicerol. También se realizaron cultivos con ambas fuentes de carbono para evaluar la capacidad de utilización simultánea de sustratos por parte de las mutantes. Se obtuvieron resultados interesantes para las cepas $\Delta arcA$ y $\Delta creC$, aunque los resultados fueron distintos a los hallados en el pasado en la cepa K1060 (Nikel 2008, Godoy 2016). Por otro lado, la mutante Δcra arrojó resultados disimiles en cuanto al impacto metabólico de la eliminación del regulador, con respecto a lo visto en la Capítulo I.

Para analizar la producción de PHB todas las cepas fueron transformadas con un plásmido que contiene los genes de síntesis de PHB de *Cupriavidus necator*, pPHB-KF (Godoy 2014), ya que *E. coli* no produce este polímero termoplástico de manera natural. La síntesis de este polímero de reserva producido por muchas especies bacterianas implica el uso de carbono y poder reductor (Nikel 2006), por lo que es de esperar que las mutaciones que afectan los flujos de carbono y el estado redox de las células también afecten a la síntesis de PHB. Se utilizó glucosa como fuente de carbono y condiciones de baja aireación, con el objetivo de comparar la síntesis de PHB no solo entre mutantes, sino también analizar posibles diferencias con la cepa K1060. Una vez más, los resultados dependieron de la cepa utilizada.

El PDO, un producto químico de alto valor, puede obtenerse mediante la fermentación microbiana de glicerol. Se realizaron cultivos en medio mínimo y rico en condiciones de aireación alta y baja de todas cepas transformadas con los genes necesarios para su síntesis. El primer factor que debimos tener en cuenta fue el desarrollo de un método analítico para determinar el diol de manera rápida

y confiable. Además, fue posible determinar las condiciones óptimas para la síntesis de PDO en la cepa BW25113 y logramos resultados prometedores entre las cepas mutantes, tanto en la producción volumétrica como el rendimiento.

Los objetivos de este capítulo pueden resumirse de la siguiente manera:

- Determinar el potencial en la síntesis heteróloga de EtOH a partir de diferentes sustratos en las distintas mutantes, sobreexpresando *adhE* de *L. mesenteroides*
- Evaluar la síntesis de PHB en las cepas mutantes a partir de glucosa
- Comparar los resultados para los puntos anteriores con los obtenidos previamente en la literatura con la cepa de *E. coli* K1060
- Desarrollar un método rápido y eficiente para determinar PDO y glicerol en sobrenadantes de cultivo
- Estudiar la producción de PDO en cada cepa y determinar las condiciones óptimas de síntesis
- Buscar patrones particulares de cada mutación en base a la síntesis de compuestos biotecnológicos por estadística multivariada

Parte de los resultados presentados en este capítulo se hallan publicados en los siguientes trabajos:

- Egoburo, D. E., Peña, R. D., Álvarez, D. S., Godoy, M. S., Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2018). Microbial Cell Factories à la Carte: Elimination of Global Regulators Cra and ArcA Generates Metabolic Backgrounds Suitable for the Synthesis of Bioproducts in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(19), e01337-18.
- Egoburo, D. E., Peña, R. D., Kolender, A., & Pettinari, M. J. (2017). Optimization and Validation of a GC–FID Method for Quantitative Determination of 1, 3-Propanediol in Bacterial Culture Aqueous Supernatants Containing Glycerol. *Chromatographia*, 80(7), 1121-1127.

Evaluación del potencial biotecnológico de las cepas mutantes de reguladores globales

En nuestro laboratorio ya se ha demostrado que la manipulación de reguladores globales ofrece nuevas alternativas de ingeniería metabólica para generar contextos adecuados para la síntesis de bioproductos. Esta estrategia no se basa en manipulaciones en genes individuales para modificar pasos puntuales de vías metabólicas, sino en la modificación de genes regulatorios para alterar numerosas vías metabólicas simultáneamente, generando nuevos entornos metabólicos. Uno de los efectos analizados en el laboratorio fue la manipulación de ArcA, que permite redirigir el flujo de carbono y poder reductor hacia compuestos químicos reducidos. Con respecto a esto, ya vimos en el capítulo anterior que las mutantes Δcra de la cepa BW25113 producen 3 veces más ácido succínico que la cepa salvaje en condiciones de baja aireación.

Teniendo todo esto en cuenta, nos propusimos evaluar el potencial biotecnológico de las mutantes de delección de la cepa BW25113 en la producción de EtOH, PHB y PDO, compuestos reducidos con alto valor industrial a partir de fuentes económicas y renovables como la glucosa y el glicerol. Para esto construimos cepas mutantes recombinantes para mejorar o permitir la síntesis de estos compuestos y realizamos cultivos en frasco agitado en distintas condiciones. En la Tabla 7 se detallan las condiciones y los sistemas de expresión de los genes recombinantes.

Compuesto	Genes heterólogos	Función de los genes heterólogos	Medio de cultivo	Fuente de carbono	Aireación
EtOH	<i>adhE</i> de <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	EtOH/acetaldehído deshidrogenasa bifuncional	LB	Glucosa/Glicerol/Glucosa + glicerol	Baja
PHB	genes <i>phaBAC</i> de <i>Ralstonia eutropha</i>	Síntesis de PHB	LB	Glucosa	Baja
PDO	Operon <i>dha</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Síntesis de PDO a partir de glicerol	M9/LB	Glicerol/Glucosa + glicerol	Baja/alta

Tabla 7. Sistemas utilizados para evaluar la síntesis de compuestos de interés biotecnológico en cada una de las mutantes para los distintos reguladores.

Etanol

Como ya vimos en el Capítulo I, *E. coli* es capaz de sintetizar EtOH a partir de acetilCoA (Figura 31) aunque en bajas concentraciones. Para mejorar la síntesis de EtOH y así estudiar mejor el efecto de las delecciones de los reguladores globales se introdujo en todas cepas el plásmido pET_{Lm}. Este plásmido contiene el gen *adhE* de *L. mesenteroides*, que codifica una alcohol deshidrogenasa más

eficiente que la de *E. coli*, permitiendo aumentar la síntesis de este alcohol (Nikel 2010). Se realizaron cultivos en condiciones de baja aireación, condición donde naturalmente se sintetiza este alcohol en *E. coli*, debido a la naturaleza de las enzimas involucradas y el metabolismo fermentativo (Figura 31). Se utilizó el medio rico LB suplementado con glucosa o glicerol o una combinación de ambos sustratos.

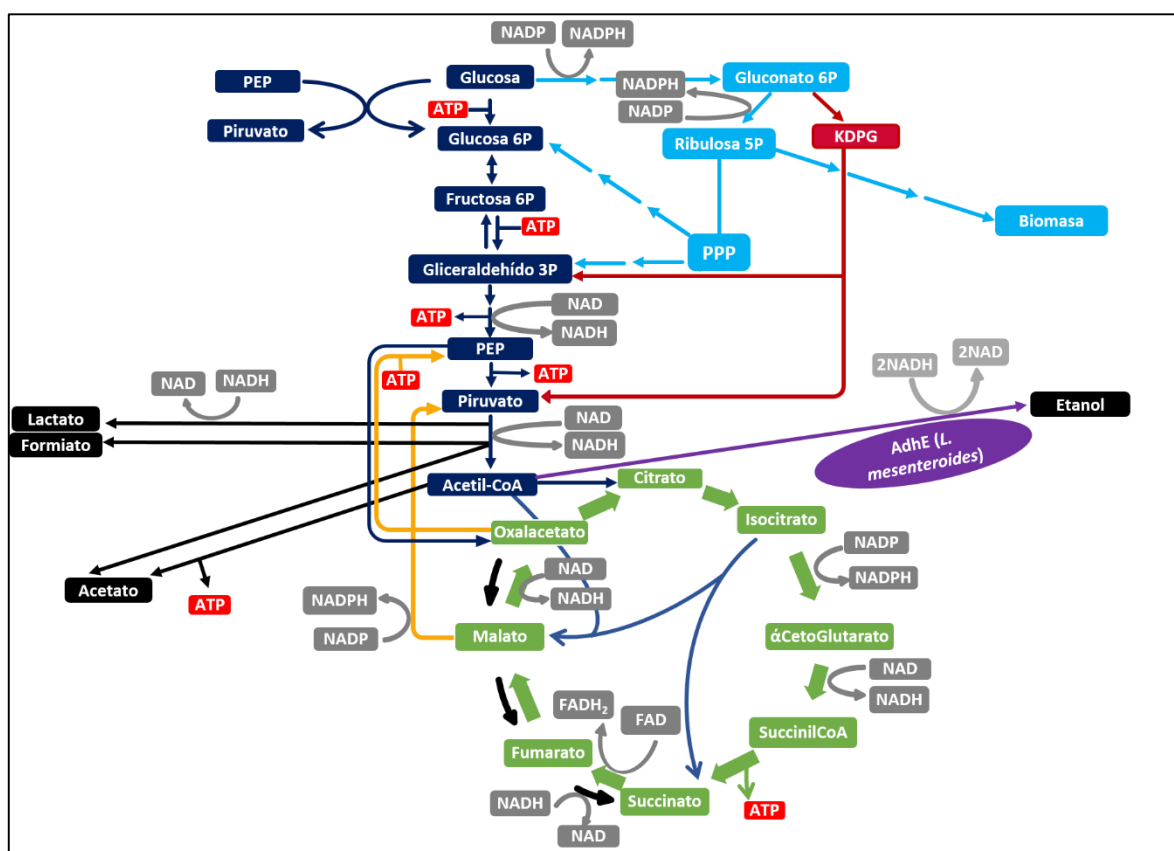


Figura 31 Esquema del metabolismo central del carbono en *E. coli*.

→: vías fermentativas. →: vía Embden-Meyerhof-Parnas. →: ciclo de Krebs. →: vía de las pentosas fosfato. →: vía Entner-Doudoroff. →: ciclo del glioxilato. →: gluconeogénesis. →: camino metabólico heterólogo introducido para evaluar la síntesis de EtOH. En gris se muestra el consumo y producción de NADH. En rojo, la síntesis y consumo de ATP. PEP: fosfoenolpiruvato, PPP: del inglés pentose phosphate pathway, KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, P: fosfato.

Síntesis de Etanol a partir de glucosa

En primer lugar, utilizamos glucosa como fuente de carbono. En este caso, las mutantes $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ produjeron 2 veces más EtOH comparado con la cepa salvaje (Figura 32) y tuvieron un mayor rendimiento también, sobre todo la cepa $\Delta arcA$ que produjo $0,95 \pm 0,20$ moles de EtOH por cada mol de glucosa consumida, más de 3 veces más que el control (Tabla 8). No se observaron

diferencias para Δrob y Δcra en comparación con la cepa salvaje. La mejora en la síntesis de EtOH en cultivos $\Delta arcA$ crecidos en glucosa en este trabajo fue similar al aumento observado en mutantes $\Delta arcA$ de la cepa K1060 (Nikel 2008), y se ha relacionado con una mayor disponibilidad de poder reductor. El aumento en la síntesis de EtOH observado para el mutante $\Delta creC$ no ha sido informado con anterioridad, pero es consistente con el efecto de la mutación de $creC$ observado en la cepa no recombinante en este trabajo, tema desarrollado en el capítulo 1 (Figura 16). Por último, la producción específica también fue significativamente mayor para las cepas $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ mientras que no hubo diferencias en cuanto al consumo de sustrato.

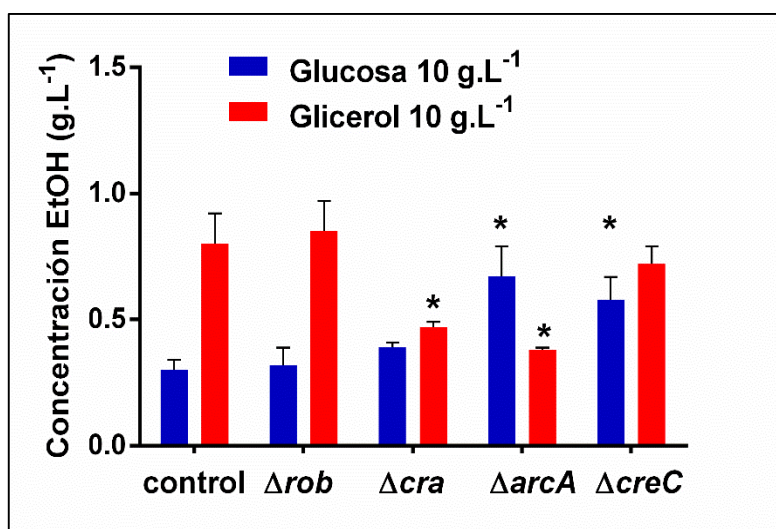


Figura 32. **Producción de EtOH en diferentes sustratos en todas las mutantes de reguladores globales.**

Todas las bacterias sobreexpresaron *adhE* de *L. mesenteroides*, bajo el control del promotor *lac*. La inducción se realizó en fase exponencial temprana ($DO_{600}=0,8$) para todos los cultivos mediante el agregado de IPTG 1mM. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar de triplicados. (*) indica diferencias significativas comparando mutantes vs el control (Prueba T, $p<0,05$).

Síntesis de Etanol a partir de glicerol

A continuación, utilizamos glicerol como fuente de carbono ya que al ser un compuesto cuya degradación genera mayor cantidad de equivalentes de reducción es más favorable para la síntesis de compuestos como el EtOH (de Almeida 2010). Además, el uso del glicerol es interesante desde el punto de vista de la sostenibilidad ya que el mismo es un subproducto industrial económico y abundante. Las cepas salvaje, Δrob y $\Delta creC$ tuvieron una síntesis de EtOH más alta comparado con su desempeño en cultivos crecidos en glucosa (Figura 32). Esto era esperable debido a lo mencionado anteriormente con respecto a las características metabólicas del glicerol. Inesperadamente, los cultivos de la mutante $\Delta arcA$ en glicerol produjeron menos EtOH que los cultivos en glucosa correspondientes, a diferencia de lo que se había visto previamente en mutantes redox de la cepa K1060 (Nikel 2008). Además, nos llamó la atención el hecho de que tanto $\Delta arcA$ como Δcra produjeron incluso menos EtOH que la salvaje cuando se compararon las cepas crecidas

en glicerol y tuvieron, consecuentemente, rendimientos menores (Figura 32, Tabla 8). Una vez más hubiéramos esperado que la mutante $\Delta arcA$ produjera mayor cantidad de EtOH por bibliografía previa (Ruiz 2012). Una posible explicación es que la menor producción de alcohol se deba al menor consumo de glicerol que esta cepa mostró con respecto al control (Tabla 8). Es sabido que esta mutante tiene dificultades en crecer en medio mínimo usando glicerol como fuente de carbono y aunque en nuestros experimentos utilizamos un medio rico como el LB, es posible que la cepa BW25113 tenga mayores exigencias nutricionales o algún impedimento para desviar el carbono proveniente del glicerol hacia EtOH. En cuanto a los resultados de la mutante Δcra , ésta también presenta un consumo significativamente menor de glicerol con respecto al control (Tabla 8).

	Producción específica (mol EtOH.mol peso seco ⁻¹)		Rendimiento (mol EtOH.mol S ⁻¹)		Consumo de sustrato (g.L ⁻¹)	
	glucosa	Glicerol	glucosa	Glicerol	glucosa	glicerol
control	0,29 ± 0,03	0,56 ± 0,03	0,3 ± 0,1	0,45 ± 0,14	5 ± 1	3,5 ± 1,0
Δrob	0,26 ± 0,06	0,65 ± 0,06	0,2 ± 0,1	0,42 ± 0,03	6 ± 1	4,1 ± 0,8
Δcra	0,34 ± 0,03	0,42 ± 0,04 *	0,4 ± 0,2	0,27 ± 0,02 *	5 ± 1	3,5 ± 0,4
$\Delta arcA$	0,53 ± 0,11 *	0,28 ± 0,05*	0,95 ± 0,20 *	0,30 ± 0,03 *	4 ± 1	2,6 ± 0,3
$\Delta creC$	0,57 ± 0,06 *	0,55 ± 0,05	0,5 ± 0,1*	0,39 ± 0,08	5 ± 1	3,8 ± 1,0

Tabla 8. Producción de EtOH en cepas recombinantes.

Los cultivos se hicieron crecer en frascos agitados utilizando medio LB suplementado con glicerol o glucosa (ambos a una concentración final de 10 g.L⁻¹) en condiciones de baja aireación. Los resultados representan el valor medio ± desviación estándar de al menos tres repeticiones independientes. La expresión de *adhE* fue inducida por la adición de IPTG 1 mM cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial temprana ($DO_{600} = 0,8$). (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y la cepa salvaje (prueba T, $p < 0,05$). EtOH: etanol. S: sustrato carbonado.

La explicación más probable es que el glicerol, debido a que es una fuente gluconeogénica, no pueda ser utilizado como precursor del EtOH. Esto se debe a que mutantes de este regulador exhiben represión de la gluconeogénesis y no son capaces de crecer en fuentes gluconeogénicas (Chin 1987), Dado que el glicerol no podría utilizarse para la síntesis de hexosas y pentosas, las bacterias deberían utilizar otros componentes del medio LB para crecer y acumular biomasa.

Uso simultáneo de glucosa y glicerol para la síntesis de etanol

A pesar de que el glicerol no es una fuente de carbono metabolizable a través del sistema PTS su uso está sujeto a represión catabólica cuando *E. coli* es crecida en glucosa y glicerol

simultáneamente (Yao 2013), posiblemente debido al control transcripcional del regulador global Crp y el nivel de enzimas del sistema PTS, entre otros factores (Bettenbrock 2005, Görke 2008). Muchas estrategias se han utilizado para evitar los mecanismos de represión y lograr que *E. coli* pueda utilizar ambas fuentes de carbono al mismo tiempo, lo cual mejora el crecimiento y la producción de compuestos (Kim 2015). Estudios previos muestran que la actividad de ArcA es importante durante el metabolismo del glicerol (Yao 2016), que Cra controla varios genes del sistema PTS y que su manipulación permite el uso simultáneo de varios azúcares (Yao 2013). Además, se sabe que otros reguladores como Mlc son claves en la represión catabólica. Por todo esto, manejamos la hipótesis que el efecto de las deleciones de reguladores globales podría aliviar la represión del uso del glicerol y así mejorar la síntesis de EtOH.

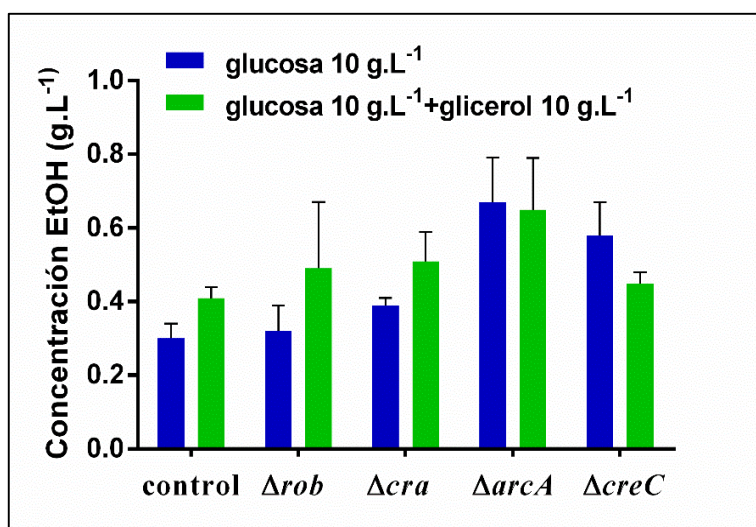


Figura 33. Producción de EtOH utilizando una mezcla de glucosa y glicerol.

Todas las mutantes expresan adhE de *L. mesenteroides*, bajo el control del promotor Lac. La inducción se realizó en fase exponencial temprana ($DO_{600}=0,8$) para todos los cultivos mediante el agregado de IPTG 1mM. Los valores representan el promedio \pm el desvío estándar de triplicados. (*) indica diferencias significativas comparando mutantes vs el control (Prueba T, $p<0,05$).

No fue posible detectar diferencias en cuanto a la concentración de alcohol alcanzada en ninguna de las cepas, con respecto al mismo experimento realizado con glucosa a las 24 hs de cultivo (Figura 33). Sin embargo, pudimos observar consumo de ambas fuentes de carbono, lo cual junto con el hecho de que logramos detectar en el sobrenadante de todos los cultivos tanto glucosa como glicerol remanente (Tabla 8), nos indica que puede haber una disminución de la represión catabólica. Desafortunadamente no tuvimos resultados concluyentes ya que la cepa salvaje también muestra consumo simultáneo de ambas fuentes de carbono. De todas maneras, el carbono adicional no es redirigido hacia la formación de EtOH en estas condiciones o en las mutantes utilizadas en el presente trabajo. Aunque se ha descrito que mutantes Δcra exhiben la capacidad de degradación simultánea de distintos azúcares y mayor producción de metabolitos (Yao 2013), parecería que esto no ocurre con el glicerol. Esto podría estar relacionado al hecho de que mutantes de este regulador

resultan ser ineficientes para utilizar sustratos gluconeogénicos cuando son la única fuente de carbono (Chin 1987), como ya se dijo.

Diferencias en el uso de sustrato

Como se ve puede ver en la Tabla 8, no fue posible detectar diferencias en el consumo de glucosa o glicerol en las condiciones de crecimiento utilizadas para la producción de EtOH. Esto nos sugiere que el aumento de este alcohol en las mutantes $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ se debe, entonces, a la redirección del flujo de carbono hacia este compuesto. En el caso de $\Delta arcA$, esto puede ser facilitado por un aumento de la disponibilidad de poder reductor, previamente reportado (Ruiz 2012). Lo que podemos deducir de los experimentos con glicerol como fuente de carbono es que incrementa la síntesis de EtOH en la cepa salvaje, como se esperaba por la mayor disponibilidad de poder reductor, pero no hubo efectos positivos en las cepas mutantes, sobre todo en las cepas $\Delta arcA$ y Δcra . Probablemente estas mutantes, aunque logran utilizar el glicerol ya que efectivamente lo consumen (Tabla 8), no puedan utilizarlo para la síntesis de EtOH. Debido a todo esto, no nos sorprendieron los resultados del último experimento, donde se ve básicamente que en los cultivos con glucosa y glicerol el sustrato utilizado para producir EtOH es la glucosa.

Síntesis de PHB

La producción de PHB es de alto interés biotecnológico como se mencionó en la introducción, tanto por su síntesis a partir de sustratos renovables como por su biodegradabilidad (Nikel 2006). Además, se observó que mutantes $\Delta arcA$ de la cepa K1060 sintetizaban más polímero, sobre todo en condiciones de baja disponibilidad de O_2 (Nikel 2006). Por este motivo, se probó el efecto de las diferentes mutaciones sobre la síntesis de PHB.

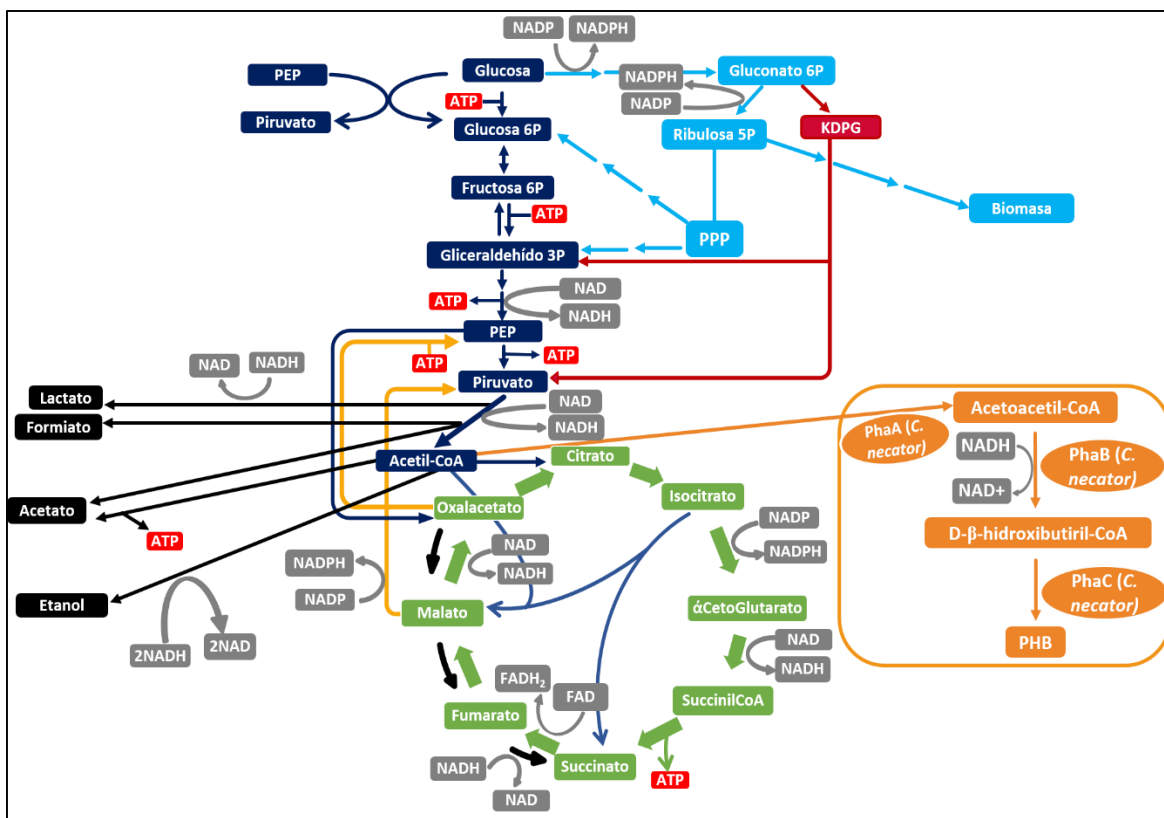


Figura 34. Esquema del metabolismo central del carbono en *E. coli*.

→: vías fermentativas. →: vía Embden-Meyerhof-Parnas. →: ciclo de Krebs. →: vía de las pentosas fosfato.
 →: vía Entner-Doudoroff. →: ciclo del glioxilato. →: gluconeogénesis. →: camino metabólico heterólogo introducido para evaluar la síntesis de PHB. En gris se muestra el consumo y producción de NADH. En rojo, la síntesis y consumo de ATP. PEP: fosfoenolpiruvato, PPP: del inglés pentose phosphate pathway, KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, P: fosfato.

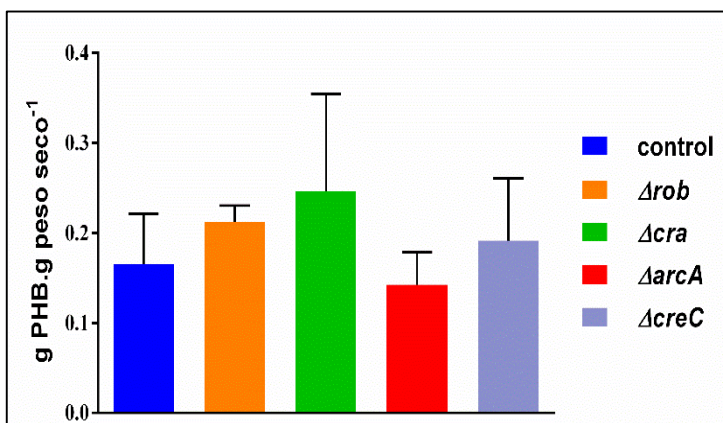


Figura 35. Producción de PHB en cepas recombinantes. Los cultivos se hicieron crecer en frascos agitados y medio LB suplementado con glucosa 10 g.L⁻¹ en condiciones de baja aireación durante 24 h. Los resultados representan el valor medio ± desviación estándar de tres repeticiones independientes. Todas las cepas albergaban el plásmido pPHB-KF (portador de los genes phaCAB de *Cupriavidus necator*). PS: peso seco celular.

Sin embargo, los cultivos de todas las mutantes de reguladores globales de nuestra cepa de trabajo acumularon cantidades de PHB similares a las de la cepa salvaje cuando fueron crecidas en LB suplementado con glucosa 1% m/v en baja aireación (Figura 35). Es más, aunque las diferencias no

fueron significativas, la cepa *ΔarcA* parece producir menor cantidad de polímero que las demás cepas. Las discrepancias en los resultados obtenidos con las cepas de *E. coli* BW25113 y K1060 pueden atribuirse a las diferencias de contexto genético, y apuntan una vez más a la cepa-dependencia de los fenotipos mutantes de reguladores globales.

Síntesis de 1,3-propanodiol

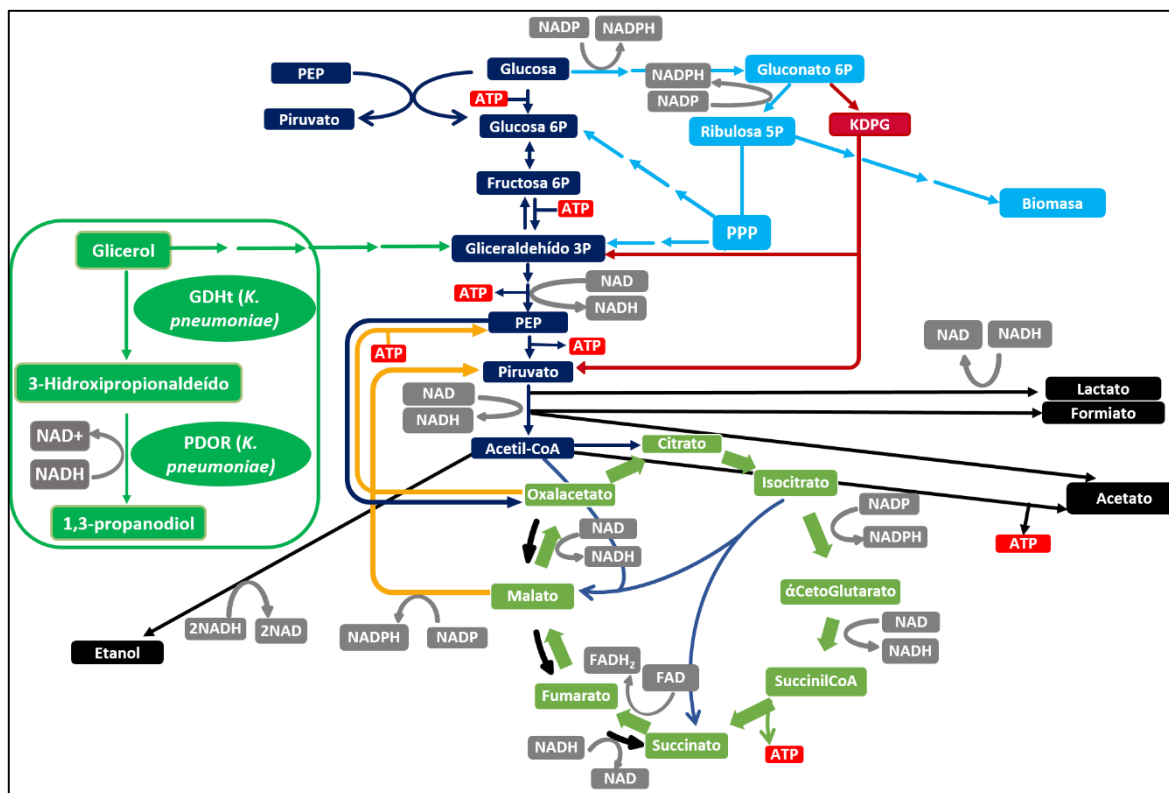


Figura 36. Esquema del metabolismo central del carbono en *E. coli*.

→: vías fermentativas. →: vía Embden-Meyerhof-Parnas. →: ciclo de Krebs. →: vía de las pentosas fosfato. →: vía Entner-Doudoroff. →: ciclo del glioxilato. →: gluconeogénesis. →: camino metabólico heterólogo introducido para evaluar la síntesis de PDO. En gris se muestra el consumo y producción de NADH. En rojo, la síntesis y consumo de ATP. PEP: fosfoenolpiruvato, PPP: del inglés pentose phosphate pathway, KDPG: 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, P: fosfato

Los genes para la formación de PDO a partir de *Klebsiella pneumoniae* GLC29 (Da Silva 2015) se utilizaron para promover la síntesis de este diol a partir de glicerol (Figura 36) en todas las cepas mutantes globales cultivadas en M9 o LB en aireación total y baja. Para poder llevar a cabo estos estudios fue necesario poner a punto la medición de PDO y glicerol en sobrenadantes de cultivo ya que la determinación de estos dos compuestos de estructura similar no es trivial.

Determinación de glicoles por cromatografía gaseosa

La determinación precisa de PDO es una tarea clave tanto para la industria como para la investigación. En las últimas décadas el mismo ha sido analizado por cromatografía gaseosa (GC) utilizando columnas empaquetadas, un método que todavía se utiliza (Zhao 2006, Garg 2008) a pesar de su mala resolución y tiempos de ejecución largos. Cabe destacar aquí que la alta polaridad y punto de ebullición de este compuesto, similares a las del glicerol, dificultan el análisis por cromatografía gaseosa. Los métodos actuales para medir este compuesto implican HPLC acoplado a un detector por índice de refracción (Cheng 2004, Wang 2007) a pesar de la baja sensibilidad y la dependencia de la temperatura de este detector universal. Solo unos pocos informes incluyen determinaciones de GC para PDO, y la mayoría de ellos no determinan glicoles en matrices complejas, como las de origen biológico (Chen 2007). Estos métodos no se pueden aplicar directamente a soluciones acuosas, y requieren pasos de extracción que consumen tiempo y que pueden afectar la recuperación del analito (Pengfei 2014). Uno de los aspectos fundamentales de esta parte del trabajo fue hallar un método confiable y rápido para la cuantificación de PDO y glicerol en sobrenadante de cultivos bacterianos, utilizando los recursos disponibles (cromatógrafo gaseoso con detector de ionización de llama).

Desarrollo del método cromatográfico

Lo más importante de un método de CG es la elección de la fase estacionaria que determinará la capacidad de análisis. La columna HP-5, la cual es no polar y cuenta con la ventaja de permitir la inyección directa de agua debido a su polaridad, fue utilizada en primer lugar. La misma resultó adecuada para la determinación de PDO, sin embargo, el glicerol no se pudo analizar en estas condiciones debido a la falta de linealidad y un pico nada simétrico (Figura 37). Las diferencias de polaridad entre el glicerol y la fase estacionaria de esta columna [(5% -fenil) -metilpolisiloxano]] podrían afectar el análisis cromatográfico.

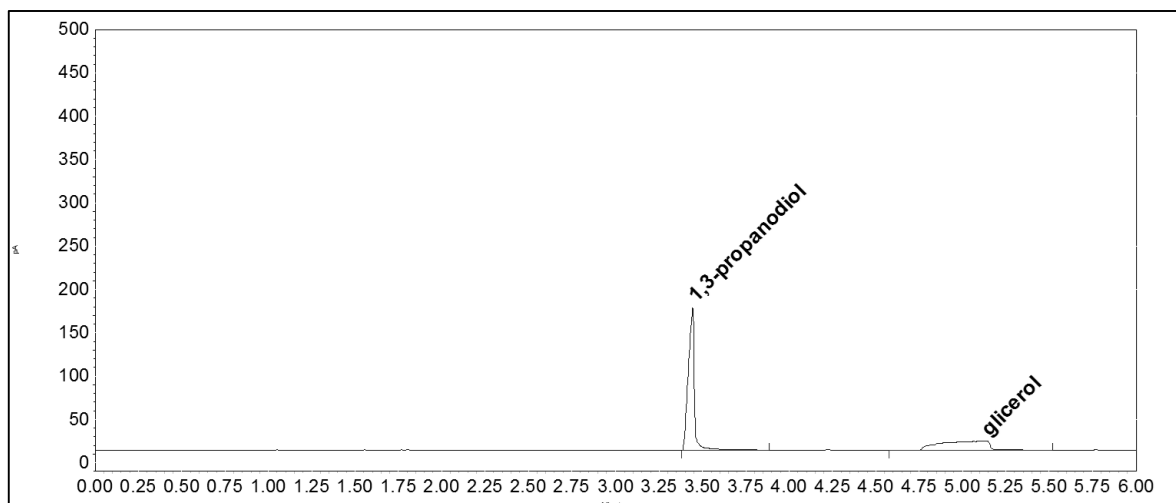


Figura 37. Cromatograma típico obtenido en la columna HP5 con inyección directa de estándares en agua o medio de cultivo.

Por esta razón, se eligió una columna con una fase estacionaria de mayor polaridad, la HP-INNOWAX con una fase de polietilenglicol, la cual está entrecruzada y permite de forma moderada inyecciones de muestras con agua como solvente (Khun 2002). Sin embargo, las formas de pico y la sensibilidad no fueron tan buenas como se esperaba. Una posible razón podría ser una interferencia del medio acuoso en la interacción entre la fase estacionaria y los analitos. Para evitar esto, el EtOH se probó como solvente, ya que se ha demostrado que es útil para la extracción de glicoles (Orton 2016). Este procedimiento tiene la ventaja adicional de reducir la cantidad de entrada de agua en el sistema cromatográfico y promover la precipitación de sal del medio de cultivo antes de la inyección de la muestra. De esta manera las muestras y estándares se diluyeron en relación 4 a 1 y esto permitió obtener formas de pico mejoradas y buena linealidad, permitiendo un análisis cromatográfico eficiente (Figura 38). Además, tuvimos en cuenta que las muestras biológicas y los medios no definidos son matrices complejas que contienen sales, desechos y componentes celulares, como proteínas que pueden bloquear la aguja. Se usaron varios lavados con agua después de la inyección para evitar la cristalización de sal y la eliminación eficiente de glicol. El EtOH se empleó para los lavados finales para reducir el contenido de agua y evitar el daño de la jeringa y la columna.

El paso siguiente fue entonces optimizar el método cromatográfico utilizando la columna de fase polar. Debido a altos puntos de ebullición para el PDO (220 °C) y el glicerol (290 °C), la temperatura del horno se optimizó para reducir los tiempos de funcionamiento. Al principio, se intentaron gradientes lentos con bajas temperaturas iniciales para minimizar el sangrado y prolongar la vida útil de la columna. Sin embargo, este enfoque dio como resultado picos anchos debido a la difusión,

altos límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) y mala reproducibilidad. La temperatura del horno se ajustó entonces a 185 ° C, cerca del punto de ebullición PDO, y dado que ninguna otra señal interfería con los picos del analito, el gradiente de temperatura se ajustó a 40 ° C/min. Este programa de temperatura disminuyó los tiempos de análisis a menos de 5 minutos, lo cual es fundamental para reducir tiempos de trabajo al contrario de los métodos de HPLC, en los cuales el tiempo de corrida se duplica o triplica. La resolución resultó superior a 4, no se observaron picos de interferencia y el factor de simetría fue inferior a 2.

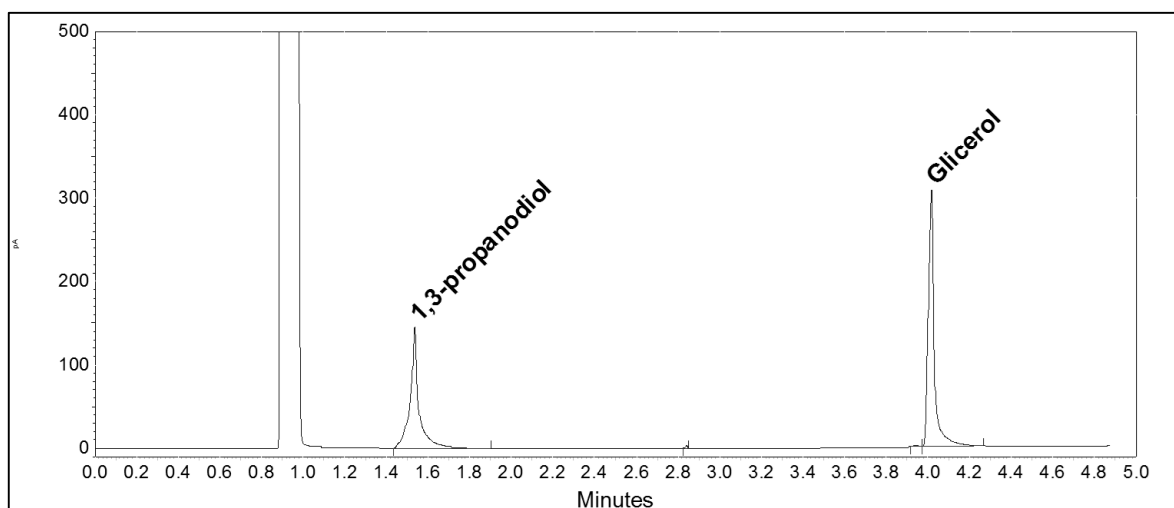


Figura 38. Típico cromatograma de glicoles utilizando el método optimizado.

Las soluciones patrón estándar se diluyeron en medio M9 hasta 3 g.L⁻¹ y 7,5 g.L⁻¹ para PDO y glicerol, respectivamente.

Validación analítica

Debido a que la cromatografía gaseosa no es un método estándar para determinar este tipo de compuestos, decidimos validarlo para asegurar la confiabilidad de las mediciones. El método fue validado de acuerdo con las directrices de la *United states Pharmacopeia* (USP) y la *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (UNODC 2009).

Linealidad y sensibilidad

Los cultivos microbianos pueden producir hasta 100 g.L⁻¹ de PDO, mientras que las concentraciones iniciales de glicerol utilizadas para este proceso se encuentran entre 10 y 40 g.L⁻¹, y pueden consumirse por completo durante el crecimiento. La linealidad se mantuvo en todo el rango: 0,05-

20 g.L⁻¹ para PDO (coeficiente de correlación R = 0,9999) y 0,5-30 g.L⁻¹ para glicerol (coeficiente de correlación R = 0,9967) como se ve en la Tabla 9.

La sensibilidad del método se evaluó mediante LOD y LOQ. Las concentraciones de LOD (Señal > 3 veces la línea de base) fueron 0,010 g.L⁻¹ para PDO y 0,025 g.L⁻¹ para glicerol. El LOQ (señal > 10 veces la línea de base) fue de 0,02 g.L⁻¹ para PDO y 0,050 g.L⁻¹ para glicerol. Para ambos compuestos, el método dio como resultado una buena sensibilidad y un ruido de base bajo.

No. de inyección	Concentración (g.L ⁻¹)	Área promedio	DER (%)	Parámetros de linealidad
PDO				
1	0,05	52985	3,13	y = 979717x + 8579
2	0,1	121502	2,89	
3	0,2	226103	2,24	
4	0,5	510153	1,98	
5	1	984280	0,68	
6	2	1919436	1,89	
7	5	4831083	2,41	
8	6	5826411	1,29	
9	10	9980557	0,77	
10	20	19557116	2,66	
Glicerol				
1	0,5	156001	2,56	y = 760572x – 586504
2	1	560345	1,81	
3	2	957362	2,72	
4	4	2140138	2,21	
5	6	3501330	0,97	
6	8	4809269	1,61	
7	10	7121176	1,17	
8	12	8778140	2,62	
9	20	15218109	0,24	
10	30	22006558	1,16	

Tabla 9. Linealidad del método.

Se evaluó mediante cinco inyecciones en diez niveles de concentración para cada uno de los analitos de interés. DER: desvío estándar relativo.

Precisión y exactitud

La precisión se probó a fondo en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad. Las concentraciones de los compuestos se eligieron de acuerdo con las esperadas para los procesos biológicos y se detallan en la Tabla 10. Los desvíos estándares relativos obtenidos fueron inferiores al 3 % en todos los casos, en conformidad con las normas ICH y USP. Para la evaluación de la exactitud, los porcentajes de recuperación se calcularon en tres niveles de concentración. Para el

PDO, la recuperación fue $97 \pm 6 \%$ y para glicerol fue $103 \pm 11 \%$. Los desvíos estándares relativos fueron $0,83 \pm 0,44 \%$ y $1,7 \pm 0,5 \%$, respectivamente. En todos los casos, los desvíos estuvieron por debajo del 3 % de acuerdo con las directrices de ICH.

	Repetibilidad ^a			Precisión inter-día ^b	Reproducibilidad ^c		
PDO							
	0,1 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	20 g.L ⁻¹	1 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹	3 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹
1	117983	991456	19337887	1039576	558819	3158673	9370859
2	125007	983181	19181450	1076574	528824	3159375	9458069
3	121515	1038232	20152012	1084199	565013	3172272	8783461
4	120371	1037324	20096406	1028671	564965	3199421	9518511
5	124917	1043134	19994328	1060221	575424	3057287	9238532
6	124302	1057648	19792606	1070446	564893	3025642	9311998
Promedio	121959	1018665	19752417	1057848	558609	3149406	9273886
DER (%)	2,48	2,83	2,31	2,05	2,86	2,04	2,59
Glicerol							
	0,5 g.L ⁻¹	6 g.L ⁻¹	20 g.L ⁻¹	10 g.L ⁻¹	4 g.L ⁻¹	7,5 g.L ⁻¹	20 g.L ⁻¹
1	176455	3633387	15236899	6088541	2566011	4856872	13499174
2	167757	3540417	14842806	6601618	2693641	4893076	13437765
3	163025	3521908	14351587	5991205	2719655	4880771	12593112
4	173012	3460438	14886584	6357880	2715942	4939590	13590933
5	166084	3478043	14874904	6504141	2761139	4717173	13332233
6	168377	3475507	15052918	6483099	2762198	4594396	12765286
Promedio	169118	3518283	14874283	6337747	2703098	4813646	13203084
DER (%)	2,87	1,66	1,82	3,87	2,68	2,49	2,89

Tabla 10. Determinación de la precisión del método.

a: Seis inyecciones consecutivas de cada estándar. b: muestras preparadas en seis días diferentes a partir de la misma solución madre. c: muestras preparadas en seis días diferentes a partir de seis soluciones de stocks diferentes. DER: desvío estándar relativo.

Estabilidad y robustez

La estabilidad de las muestras almacenadas a temperatura ambiente o a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se determinó según lo indicado en materiales y métodos. Los desvíos estándares relativos se compararon con el tiempo inicial para ambas condiciones. Después de 24 horas, los desvíos estándares relativos dieron como resultado menos del 10% en todos los casos, lo que indica una buena estabilidad de la muestra. A pesar de la alta volatilidad del EtOH, la preparación de la muestra resultó adecuada para el análisis de glicoles y no se observaron diferencias apreciables entre ambas condiciones de temperatura (Tabla 11).

Además, debido a que el método no implica pasos de extracción, se analizó el efecto de diferentes matrices debido a la complejidad de las muestras biológicas. Se utilizaron cuatro matrices diferentes, incluidos los medios de cultivo empleados para el cultivo microbiano (M9, TSD, LB y NB) que tienen diferentes proporciones de compuestos orgánicos, y agua, para evaluar la selectividad del método para los analitos de interés. Las áreas de los picos, los tiempos de retención y la reproducibilidad se analizaron comparando cada matriz con el medio M9 (Tabla 12, Figura 39). Los valores de coeficiente de variación (CV) obtenidos fueron inferiores al 15%, lo que demuestra que los efectos de la matriz no fueron significativos.

Todo esto sugirió que el método selectivo y con buena estabilidad de muestra según la USP.

Tiempo (hs)	-20°C		Temperatura ambiente	
	Area promedio	DER (%)	Area Promedio	DER (%)
PDO				
0	1045877	-	1067875	-
1	1047380	0,10%	1046592	1,44%
3	1041545	0,29%	1047258	1,39%
5	1008817	2,60%	1020291	3,30%
24	982115	4,59%	981735	6,20%
Glicerol				
0	6049566	-	6058206	-
1	6009379	0,47%	5912316	1,74%
3	5855863	2,34%	5879168	2,15%
5	5608815	5,56%	5573920	6,14%
24	5525106	6,71%	5433234	8,13%

Tabla 11. Determinación de la estabilidad de las muestras a diferentes temperaturas.

Se informa el % de desviación estándar relativa para cada tiempo en comparación con el tiempo 0. DER: desvío estándar relativo. El promedio de áreas se obtuvo de 3 muestras independientes.

Por último y teniendo en cuenta que los metabolitos producidos por diferentes microorganismos y las condiciones de crecimiento pueden modificar el pH final de los medios de cultivo, se evaluó el efecto del pH. Probamos dos condiciones de pH (5 y 8) y estimamos el efecto del pH comparando cada condición con el pH 7, valor de pH del medio M9 (Tabla 13). Los CV obtenidos para cada pH fueron menores del 5%, lo que demuestra que el método podría usarse en un amplio rango de pH, según los requerimientos del ICH.

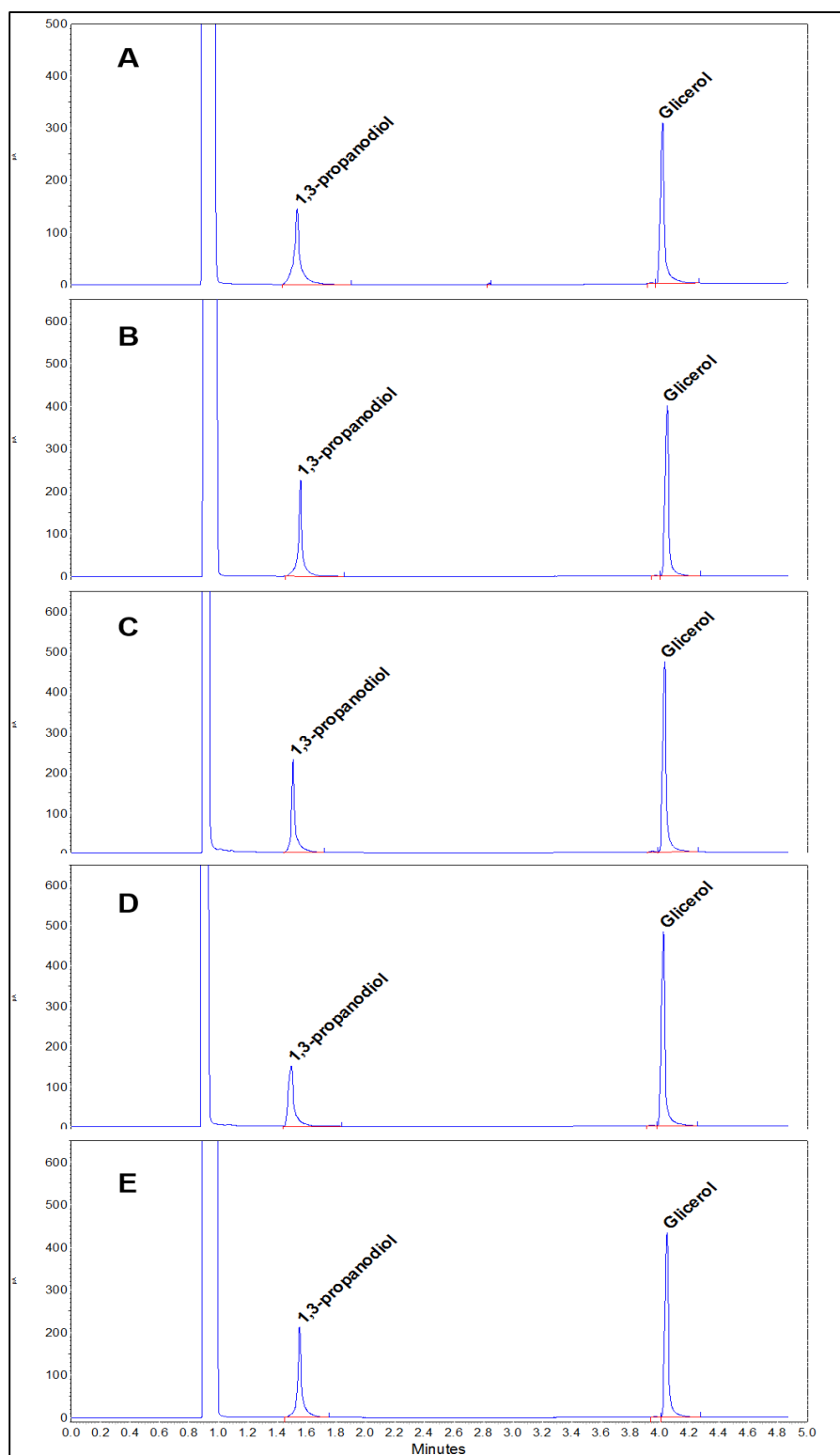


Figura 39. Efecto matriz.

Comparación de cromatogramas de PDO y glicerol. Las soluciones patrón de estándares de ambos compuestos se diluyeron en los medios de cultivo A) M9, B) agua, C) TSD D) NB y E) LB. Las concentraciones utilizadas para este experimento fueron 3 g.L^{-1} y $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ para PDO y glicerol, respectivamente.

Matriz	Area promedio	Tiempo de retención	Repetibilidad (DER%)	Reproducibilidad (DER%)	Factor matriz	Factor matriz promedio	CV (%)
PDO							
M9	3164368	1,528	2,88%	1,84%	1,00	1,04	8,75
H ₂ O	3300178	1,553	0,98%	3,14%	1,04		
TSD	3258966	1,552	2,89%	3,72%	1,03		
LB	2964998	1,528	0,97%	1,78%	0,94		
NB	3731373	1,503	3,14%	3,08%	1,18		
Glicerol							
M9	4954523	4,032	2,56%	1,76%	1,00	1,14	12,27
H ₂ O	5272928	4,048	1,34%	3,67%	1,06		
TSD	5757243	4,048	2,56%	2,90%	1,16		
LB	5406485	4,037	0,67%	3,12%	1,09		
NB	6743953	4,023	1,01%	2,34%	1,36		

Tabla 12. **Evaluación del efecto matriz en diferentes medios.**

DER: desvío estándar relativo. CV: coeficiente de variación.

pH	Area	Tiempo de retención	Factor pH	Factor matriz promedio	CV (%)
PDO					
7	2801072	1,487	1,00	1,01	1,04
5	2839277	1,510	1,01		
8	2859321	1,152	1,02		
Glicerol					
7	4080960	3,980	1,00	0,97	4,42
5	4020890	3,986	0,99		
8	3752683	3,987	0,92		

Tabla 13. **Determinación de la robustez del método.**

Factor de respuesta en medio M9 en tres condiciones de pH diferentes, CV: coeficiente de variación. Las concentraciones utilizadas fueron 3 g.L⁻¹ de PDO y 7,5 g.L⁻¹ de glicerol en M9.

Conclusiones sobre el método

Se optimizó un método de GC-FID simple y rápido para el análisis simultáneo de PDO y glicerol en cultivos bacterianos, técnica fundamental para los ensayos realizados durante esta tesis. El método fue exhaustivamente validado de acuerdo con las pautas de la USP y la ICH. Mostró alta sensibilidad, reproducibilidad, repetibilidad, precisión y tuvo un comportamiento lineal en el rango de concentraciones esperado para ambos compuestos. El método no presentó efectos de matriz significativos, por lo que podría usarse para medir PDO en diferentes sistemas biológicos y extrapolarse a otros procedimientos.

Producción de PDO en mutantes de reguladores globales

Síntesis de PDO en medio mínimo M9

Cuando los cultivos se hicieron en M9 no se observaron diferencias significativas en la concentración de PDO bajo ninguna condición de aireación. Sin embargo, se detectó una concentración final ligeramente mayor de PDO en la mutante $\Delta arcA$ en baja aireación a pesar de una reducción del 44% en el consumo de glicerol (Tabla 14). Esperábamos un posible aumento en esta cepa debido a que, en trabajos anteriores, la mutante $\Delta arcA$ de la cepa K1060 había mostrado un incremento en la síntesis de compuestos reducidos en microaerobiosis (Ruiz 2012). Se observó, de forma similar, un leve aumento en el título de PDO para la cepa Δcra , pero, además, se encontró que tenía una productividad específica significativamente mayor en ambas condiciones de aireación. Esto probablemente se debe a su capacidad reducida para usar fuentes de carbono gluconeogénicas (Chin 1987), similar a lo que sucedía en los experimentos de producción de EtOH siendo aquí más evidente el efecto ya que el glicerol es la única fuente de carbono. Por lo tanto, esta cepa muestra menor biomasa y menor consumo de glicerol y nos indica, tal vez, un alto potencial para conversión de glicerol en PDO. Por último, $\Delta creC$ mostró una disminución marcada en el consumo de glicerol en comparación con la cepa parental en cultivos crecidos en M9 en baja y alta aireación (aproximadamente 50% y 40%, respectivamente) (Tabla 14). Esto está en línea con las observaciones previas que describían un crecimiento alterado para mutantes $\Delta creC$ de DH5 α en medio mínimo suplementado con glicerol como única fuente de carbono (Cariss 2008).

	Concentración de PDO (g.L ⁻¹)		Producción específica (mol PDO.mol Peso seco ⁻¹)		Rendimiento Y _{P/S} (mol 1.3-PDO.mol gli ⁻¹)		Consumo de sustrato (g.L ⁻¹)	
	BA	AA	BA	AA	BA	AA	BA	AA
control	0,72 ± 0,08	1,5 ± 0,5	1,50 ± 0,13	0,40 ± 0,07	0,63 ± 0,17	0,17 ± 0,09	1,9 ± 0,3	19 ± 1
Δrob	0,73 ± 0,10	1,00 ± 0,03	1,30 ± 0,12	0,47 ± 0,08	0,53 ± 0,12	0,10 ± 0,01	1,9 ± 0,4	14 ± 3
Δcra	0,88 ± 0,11	1,5 ± 0,3	2,40 ± 0,42 *	0,85 ± 0,21 *	0,71 ± 0,17	0,23 ± 0,02	1,6 ± 0,3	8 ± 1 *
$\Delta arcA$	0,90 ± 0,02	1,6 ± 0,5	1,50 ± 0,12	0,56 ± 0,08	0,81 ± 0,10	0,14 ± 0,07	1,0 ± 0,2 *	15 ± 3
$\Delta creC$	0,66 ± 0,07	1,2 ± 0,3	1,40 ± 0,06	0,35 ± 0,05	0,85 ± 0,03	0,11 ± 0,02	0,9 ± 0,1 *	12 ± 1 *

Tabla 14. Producción de PDO en medio mínimo.

Los cultivos se crecieron en frascos agitados y medio M9 suplementado con glicerol 10 y 30 g.L⁻¹ para condiciones de baja y alta aireación, respectivamente durante 24 h. Los resultados representan el valor medio ± desviación estándar de tres repeticiones independientes. Todas las cepas albergaban el plásmido pBBR1MCS-2::dha (que porta el operón dha de *K. pneumoniae*). (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa de tipo salvaje (prueba T, p < 0,05), PDO: 1,3-propanodiol, gli: glicerol, BA: baja aireación, AA: alta aireación.

Síntesis de PDO en medio rico

Se realizaron los mismos experimentos en medio LB, con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas para la producción del diol en este sistema, pensando en que era posible que hubiera un problema nutricional que perjudicara la síntesis del diol en medio mínimo. En el caso de los cultivos en aireación baja, utilizamos las mutantes Δcra y $\Delta arcA$, ya que mostraron leves diferencias con respecto a la cepa control, como vimos en la sección anterior. Sin embargo, no vimos diferencias en cuanto a la concentración del compuesto ni productividad específica (Tabla 15).

Cepa	Concentración de PDO (g.L ⁻¹)	Consumo de sustrato (g.L ⁻¹)	Rendimiento Y _{P/S} (mol 1.3-PDO.mol gli ⁻¹)	Producción específica (mol PDO.mol Peso seco ⁻¹)
control	1,80±0,29	24,99±10	0,76±0,17	2,42±0,14
Δcra	1,76±0,30	18,17±4	0,63±0,33	2,27±0,17
$\Delta arcA$	1,57±0,14	17,48±7	0,60±0,22	2,76±0,48

Tabla 15. Producción de PDO en medio LB y baja aireación.

Los cultivos se crecieron en frascos agitados y medio LB suplementado con glicerol 10 para condiciones de baja aireación durante 24 hs. Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de tres repeticiones independientes. Todas las cepas albergaban el plásmido pBBR1MCS-2: dha (que porta el operón dha de *K. pneumoniae*). (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa de tipo salvaje (prueba T, $p < 0,05$). PDO: 1,3-propanodiol, gli: glicerol.

Por el contrario, cuando se realizaron experimentos en alta aireación, se encontró un incremento marcado en los mutantes $\Delta arcA$ que produjeron 2,5 veces más que el resto de las cepas, alcanzando $10,0 \pm 0,2$ g.L⁻¹ en cultivos en frasco agitado durante 24 hs (Figura 40). El consumo de glicerol aumentó considerablemente en esta mutante en comparación con el control, pero aparentemente el sustrato se usó principalmente para la síntesis del diol, ya que tanto los rendimientos de PDO como la producción específica aumentaron notablemente en los mutantes $\Delta arcA$ (Tabla 15). No se observaron diferencias significativas en la concentración de diol entre el resto de las mutantes y la cepa salvaje (Figura 40), incluida la cepa Δcra que había evidenciado una producción específica más alta de PDO en medio mínimo. De hecho, esta última mostró además menor producción específica y menor rendimiento en estas nuevas condiciones (Tabla 16).

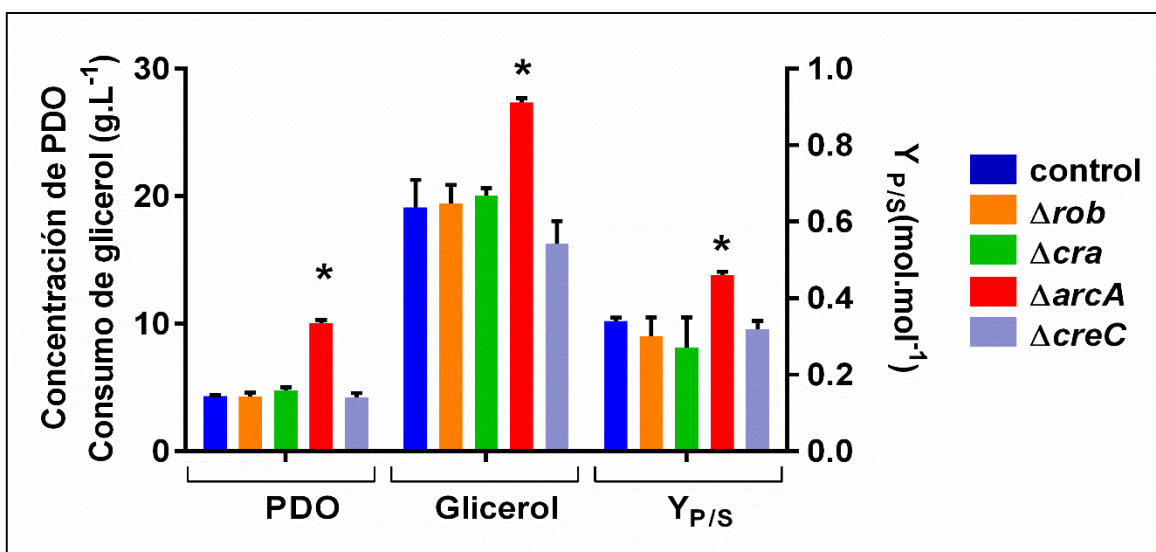


Figura 40. Producción de PDO en cepas de *E. coli* recombinantes.

Los cultivos se hicieron crecer en frascos agitados en LB suplementado con 30 g.L⁻¹ de glicerol en condiciones totalmente aireadas durante 24 hs. Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de tres repeticiones independientes. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* BW25113 como control (salvaje) y sus mutantes (Δrob , Δcra , $\Delta arcA$ y $\Delta creC$). Todas las bacterias albergaban el plásmido pBBR1MCS-2::dha (que porta los genes para la síntesis de PDO). El rendimiento corresponde a PDO/glicerol. (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa control (prueba T, $p < 0.05$). PDO: 1,3-propanodiol.

Cepas	Rendimiento (mol PDO.mol glicerol ⁻¹)	Consumo de glicerol (g.L ⁻¹)	Productividad específica (mol PDO.mol Peso seco ⁻¹)
Control	0,39 \pm 0,01	16,0 \pm 0,4	0,62 \pm 0,03
Δcra	0,32 \pm 0,02 *	12,0 \pm 0,6	0,45 \pm 0,04 *
$\Delta arcA$	0,46 \pm 0,02 *	32 \pm 4 *	1,40 \pm 0,15 *

Tabla 16. Producción de PDO en medio complejo y alta aireación.

Los cultivos se crecieron en LB suplementado con glicerol 30 g.L⁻¹ en frascos agitados en condiciones de alta aireación durante 24 hs. Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de triplicados de al menos dos cultivos independientes. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* BW25113 como control y sus derivados Δcra y $\Delta arcA$. Todas las cepas albergaban los plásmidos pBBR1MCS-2::dha (que portan los genes para la síntesis de PDO).

Considerando que la síntesis de PDO requiere poder reductor, no es sorprendente que las mutantes $\Delta arcA$ produzcan cantidades mayores de este compuesto. Estos resultados están de acuerdo con la síntesis aumentada de otros metabolitos reducidos observados en los mutantes $\Delta arcA$ de la cepa K1060 (Pettinari 2008). Inesperadamente, los mayores cambios se produjeron en condiciones de alta aireación y no en condiciones de baja tensión de oxígeno como se esperaba teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la *E. coli* K1060. Esto podría explicarse en base a las caracterizaciones metabólicas previas de esta mutante de la colección Keio, que revelaron cambios importantes en el

flujo de carbono a través del ciclo de Krebs en sobre todo en condiciones aeróbicas, donde el flujo a través del TCA se incrementa en casi un 40 %, (Nizam 2009). Esto conduce a una mayor disponibilidad de NADH, que podría canalizarse a su vez hacia la síntesis de PDO.

Los resultados obtenidos muestran que las concentraciones del diol alcanzadas dependen fuertemente de las condiciones de cultivo. En particular se observa un aumento muy importante en la síntesis de PDO en LB y alta aireación (Figura 41). Evidentemente, la síntesis de este diol requiere alto poder reductor y la cepa BW25113 se desempeña mejor en un medio de cultivo rico como el LB cuando se trata de producir este compuesto. Puntualmente, se sabe que la mutante $\Delta arcA$ de la cepa K1060 crece con mayor dificultad en medio mínimo (Nikel 2008) y, por otro lado, el uso de glicerol muchas veces requiere un medio rico para una metabolización eficiente (Durnin 2009). Tiene sentido que debido a estas razones no pudimos detectar mayor producción de PDO en esta mutante en el resto de las condiciones.

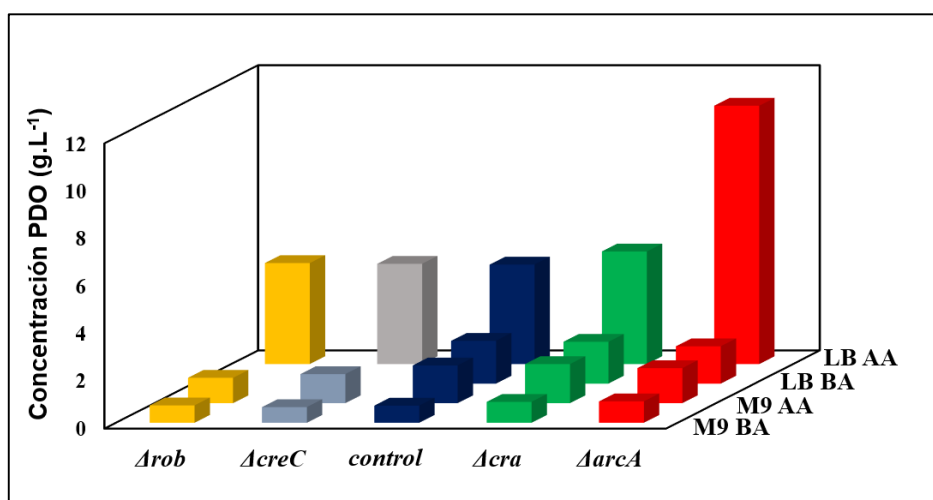


Figura 41. **Optimización de las condiciones de cultivo para síntesis de PDO.**

Los medios M9 y LB fueron utilizados como medio mínimo y rico, respectivamente. En todos los casos se utilizó glicerol como fuente de carbono. BA: baja aireación. AA: alta aireación.

Síntesis de PDO en cultivos de la cepa Δcra a partir de glucosa y glicerol

De acuerdo a lo visto para la cepa Δcra en medio mínimo, donde su producción específica de PDO fue notablemente mayor a la obtenida por la cepa salvaje (Tabla 10), nos preguntamos si este contexto metabólico estaba siendo limitado para la producción de PDO por su dificultad para asimilar fuentes gluconeogénicas, como es el glicerol (Chin 1987). Por este motivo, nos interesó estudiar la producción de PDO en cultivos creciendo simultáneamente en glucosa y glicerol, ya que,

como vimos en los cultivos de producción de EtOH, esta mutante fue capaz de utilizar ambas fuentes de carbono en medio complejo simultáneamente (Figura 33). Nuestra hipótesis era que la glucosa podría ser rápidamente utilizada para la producción de biomasa y energía, mientras que el glicerol (cuyo ingreso a las células se puede dar por difusión facilitada simple) podría direccionarse hacia la síntesis del solvente, teniendo en cuenta que la vía de producción recombinante de PDO es paralela al metabolismo central, como así lo indican reportes previos que muestran que la combinación de estos sustratos resulta una producción más eficiente de PDO (Figura 36).

Sin embargo, cuando realizamos las curvas de crecimiento y producción de diol en ambas cepas en condiciones de baja aireación, no pudimos observar diferencias significativas en la síntesis ni en la acumulación de biomasa. De hecho, la cinética de crecimiento y producción de PDO fue más lenta en la cepa Δcra (Figura 42). La tasa de crecimiento máxima fue de $(0,31 \pm 0,01) \cdot h^{-1}$ para la cepa salvaje vs. $(0,30 \pm 0,01) \cdot h^{-1}$ para la cepa Δcra .

Estos resultados indican que nuestra hipótesis no era correcta. Es decir, no se observó un aumento en la síntesis de PDO debido al uso simultáneo de ambas fuentes de carbono. Es probable que la falta de poder reductor (en estas condiciones la relación EtOH/Acetato no fue distinta a la del control) o posiblemente, como vimos en el capítulo I, el aumento de la sensibilidad de la cepa Δcra a la mayoría de los compuestos estresantes que examinamos, sean responsables de la disminución en la velocidad de síntesis y en la producción volumétrica de PDO en esta mutante con respecto al control.

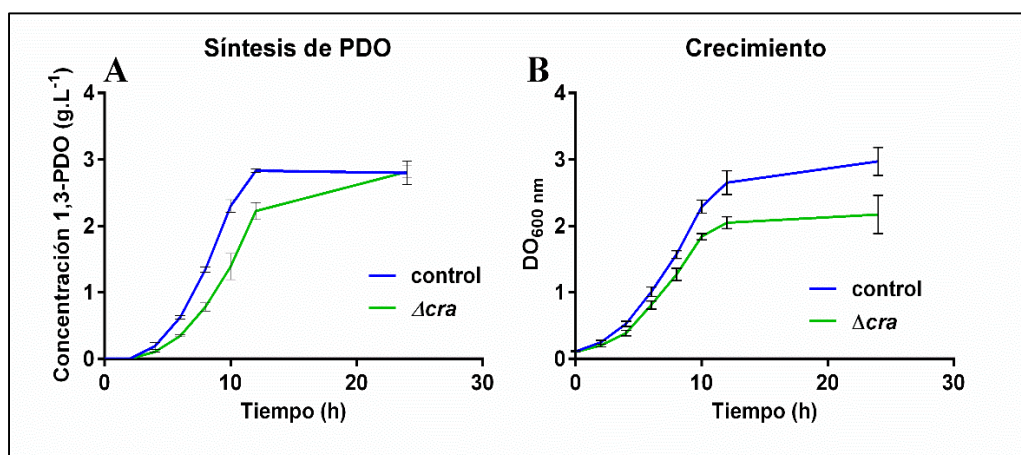


Figura 42. Cinética de producción de PDO (A) y de crecimiento (B) en cepas de *E. coli* recombinantes.

Los cultivos se hicieron crecer en frascos agitados en M9 suplementado con glicerol y glucosa en condiciones de baja aireación durante 24 hs. Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de tres repeticiones independientes. Todas las bacterias contenían el plásmido pBBR1MCS-2::dha (que porta los genes para la síntesis de PDO).

Estadística multivariada para el análisis de patrones fenotípicos

Variables consideradas en el análisis

En el capítulo I mostramos como el patrón de distribución y agrupamiento de las muestras era diferente y con cierto grado de solapamiento cuando se hacían los ACP de variables sólo relacionadas a un tipo ensayo (metabólicas o de tolerancia). Sin embargo, fue posible distinguir grupos relativamente definidos con un mínimo solapamiento cuando todos los resultados eran tenidos en cuenta en la construcción de las componentes principales. Esto nos motivó a agregar en el análisis los resultados del presente capítulo en cuanto a la obtención de compuestos biotecnológicos. Esto incluye crecimiento de todas cepas en medio mínimo en distintas condiciones de aireación, el perfil metabólico, la tolerancia a distintos compuestos generadores de estrés y la producción recombinante de EtOH, PDO y PHB, en las distintas condiciones de cultivo analizadas.

Análisis por componentes principales y análisis discriminante

Las CP1 y CP2 explicaron más del 44% de la varianza total y revelaron grupos bien definidos sin solapamiento. Cuando todos los parámetros se consideraron simultáneamente en un análisis integral las mayores distancias se observaron notablemente entre el tipo salvaje y las cepas con deleciones en los genes regulatorios *cra* y *arcA* (Figura 43 A). En el otro extremo, la mutante *Δrob*, que solo mostró diferencias en la formación de ácidos orgánicos en comparación con la cepa de control, exhibió una superposición considerable con la cepa salvaje en el APC. Por último, la cepa *ΔcreC* también se superpuso con *Δrob* y el control (figura 43 A) a pesar de algunas diferencias significativas encontradas al comparar algunas de las características individuales, como la producción de algunos ácidos y EtOH (Capítulo I). Para intentar ver si podíamos confirmar el hallazgo de este patrón agregamos un análisis discriminante. Este mostró resultados muy similares a los obtenidos por componentes principales, pudiendo observarse distancias y grupos más definidos, consistente con el hecho de que este análisis tiende a maximizar diferencias entre las muestras para poder discriminar grupos (Figura 43 B). Puede destacarse que la cepa *Δrob* formó un grupo más discreto y alejado de la cepa salvaje que la cepa *ΔcreC*, que evidenció cierto solapamiento.

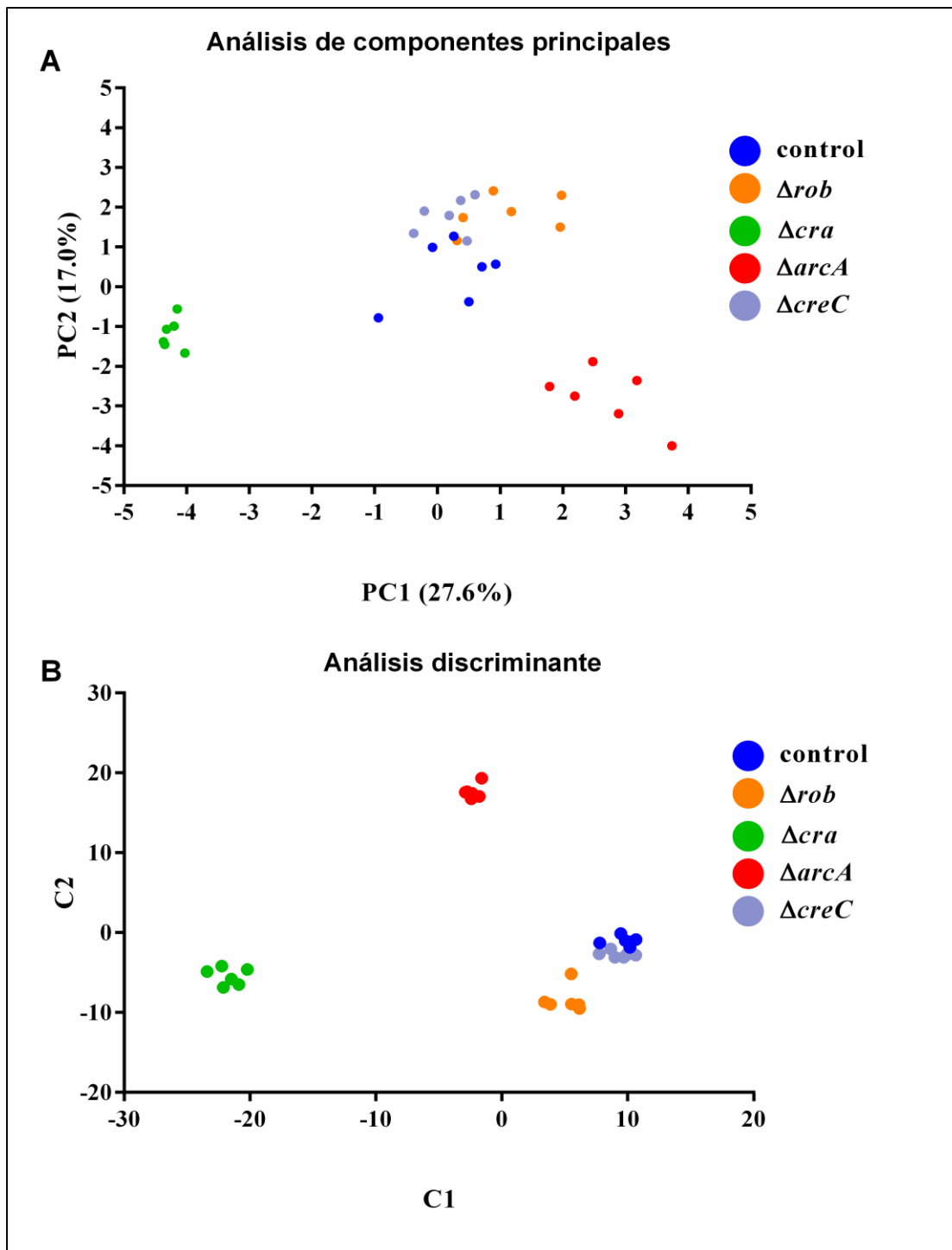


Figura 43. Análisis multivariado del efecto causado por la ausencia de diferentes reguladores globales en *E. coli* BW25113.

El análisis se realizó mediante Análisis de Componentes Principales (A) y Análisis Discriminante (B). Ambas estadísticas se basaron en 21 variables, incluida la producción de metabolitos nativos y no nativos, el crecimiento en M9 y los ensayos de tolerancia. Se usaron triplicados de 2 experimentos independientes (n=6).

Determinación de distancias entre cepas por Análisis de Agrupación Jerárquica

Con el objetivo de reforzar lo hallado con respecto a la distribución de las cepas en función de las variables analizadas, realizamos también un análisis de agrupación jerárquica, el cual: i- condensa la variabilidad encontrada en distancias entre grupos y ii- no conoce a priori qué muestras pertenecen a qué grupos, en este caso cepas. Utilizando el algoritmo de Ward y la distancia Euclidiana, el análisis de agrupamiento jerárquico de todos los datos fue capaz de distinguir grupos separados correspondientes a la cepa salvaje y a cada uno de los mutantes (Figura 44). Las distancias entre los grupos fueron congruentes con las separaciones observadas en el ACP, ya que la mutante Δcra mostró la distancia máxima desde el grupo control, seguido por la mutante $\Delta arcA$. Finalmente, las cepas salvaje, Δrob y $\Delta creC$ se agruparon en *clusters* distintos pero estrechamente relacionados (figura 44), lo cual también es congruente y concuerda con los resultados obtenidos por los 2 métodos estadísticos previos.

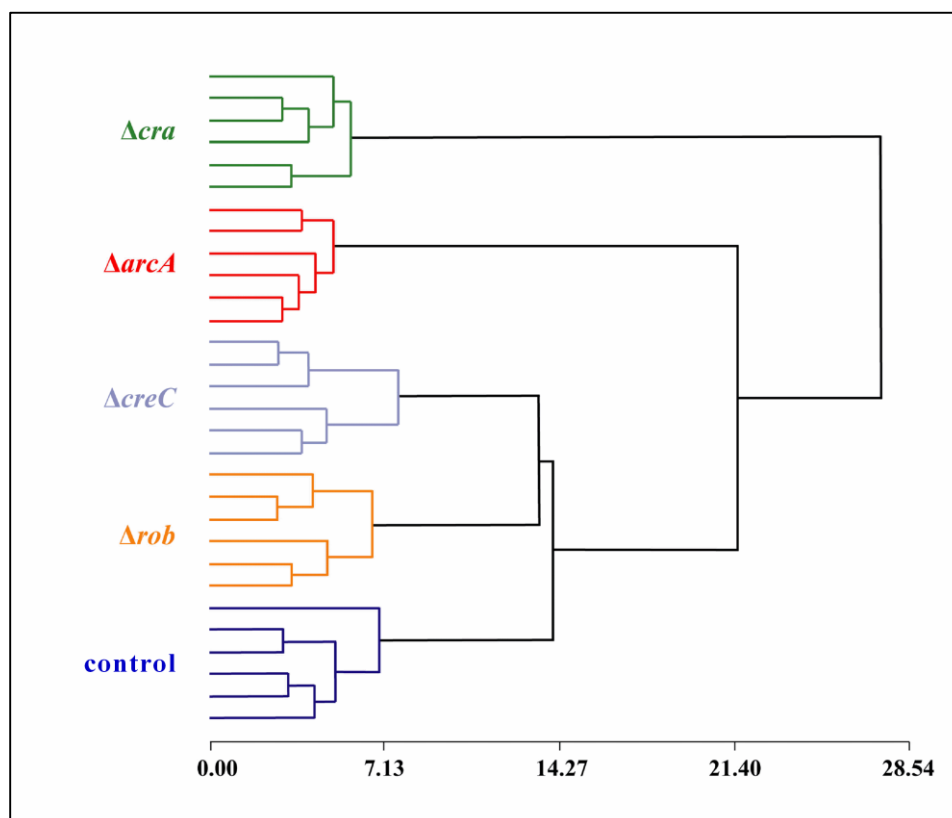


Figura 44. Análisis jerárquico del efecto causado por la ausencia de diferentes reguladores globales en *E. coli* BW25113.

El análisis se realizó mediante Análisis de Agrupamiento Jerárquico, basado en 21 variables incluidas: la producción de metabolitos nativos y no nativos, el crecimiento en M9 y los ensayos de tolerancia. Se usaron triplicados de dos experimentos independientes ($n = 6$).

Discusión y conclusiones

Producción de biocompuestos

Evaluamos el potencial de cada mutante de regulador global en la síntesis de compuestos relevantes a nivel biotecnológico. Con respecto al EtOH vimos un aumento considerable (el doble en promedio), comparado con lo obtenido en la cepa salvaje, en la síntesis en las mutantes de delección $\Delta arcA$ y $\Delta creC$, alcanzando $0,67 \pm 0,12 \text{ g.L}^{-1}$ y $0,58 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente en cultivos crecidos a partir de medio rico suplementado con glucosa. El efecto visto en $\Delta arcA$ es similar a lo que ocurre en la cepa K1060 y se asocia a una mayor disponibilidad de poder reductor, fundamental para la síntesis de compuestos como el EtOH (Nikel 2008). En el caso de la cepa $\Delta creC$, aunque no hay reportes previos del aumento en la síntesis de EtOH, nuestro resultado es congruente con lo observado en la misma cepa no recombinante en cuanto a su perfil metabólico.

Luego, decidimos repetir estos cultivos, pero utilizando glicerol. Sabíamos de bibliografía previa que el glicerol al generar mayor cantidad de equivalentes de reducción que la glucosa, da como resultado el aumento en la síntesis de compuestos reducidos (Nikel 2008). Sin embargo, en este caso, no pudimos ver ese efecto salvo para la cepa salvaje. Llamó nuestra atención que en la cepa $\Delta arcA$ detectamos una disminución significativa en la producción de alcohol, igual que sucedió con la cepa Δcra . Asociamos este efecto al hecho de que ambas cepas mostraron una disminución en el consumo de glicerol o la falta de poder reductor.

Finalmente, utilizamos ambos sustratos en simultáneo, teniendo en cuenta que muchos reguladores globales afectan el metabolismo central y disminuyen la represión catabólica del carbono causada por la glucosa (Gork 2008, Yao 2013). A pesar de que detectamos consumo simultáneo de las 2 fuentes de carbono en todas las cepas, incluyendo la cepa salvaje, lo cual es llamativo ya que se sabe que existe represión entre glucosa y glicerol (Gorke 2008), no se vieron diferencias en la síntesis de EtOH, siendo los resultados muy similares a los obtenidos en cultivos que sólo utilizaban glucosa. Teniendo esto en cuenta, es posible que la glucosa sea consumida más rápidamente que el glicerol bajo estas condiciones.

En cuanto al PDO, estudiamos varias condiciones al no saber *a priori* cuales podrían ser las óptimas. Utilizando medio mínimo no pudimos observar grandes diferencias en la síntesis de solvente bajo ninguna condición de aireación, aunque existieron leves aumentos para las cepas $\Delta arcA$ y Δcra , con respecto a la cepa salvaje. Lo que podemos mencionar es que ambas cepas mostraron un aumento significativo en la producción específica, lo cual podría indicar un aumento en la capacidad para

convertir glicerol en PDO. Tampoco hubo diferencias cuando probamos un medio rico como el LB y condiciones de baja aireación pero finalmente, pudimos evidenciar un aumento notable (más del doble) en las concentraciones de este diol en alta aireación llegando a más de 10 g.L^{-1} en la cepa $\Delta arcA$, siendo la única que mostró diferencias importantes con respecto a la cepa salvaje. Además, esta mutante mostró un aumento considerable en el consumo de glicerol. Esto no es de sorprender, teniendo en cuenta la bibliografía previa que indica que estas mutantes poseen un exceso de poder reductor (Ruiz 2012) y nos indica que esta cepa tiene un potencial notable en la síntesis de PDO en estas condiciones de cultivo a partir de glicerol, una fuente de carbono renovable y económica. El hecho de que no hallamos diferencias en condiciones de baja aireación podría residir en el hecho de que mutantes $\Delta arcA$ de la cepa que utilizamos aquí, la BW25113, muestra sobre todo un aumento de la actividad del TCA en aerobiosis (Nizam 2009). Por otro lado, la oxidación del glicerol es más eficiente en un medio rico en *E. coli*, lo cual explicaría lo visto en medio mínimo.

Por último, en cuanto al PHB, si bien esperábamos tener diferencias al menos con la cepa $\Delta arcA$ por resultados de trabajos previos (Nikel 2006), no encontramos diferencias en la acumulación de este polímero para ninguna cepa en cultivos crecidos en LB+ glucosa y baja aireación. Teniendo en cuenta los resultados con el PDO, no se descarta que en otras condiciones de disponibilidad de O_2 pudieran evidenciarse posibles efectos provenientes de la delección de estos reguladores globales.

Diferencias con la cepa K1060

En la introducción se mencionó en base a varios trabajos previos en nuestro laboratorio, que la manipulación en cepas $\Delta arcA$ y $\Delta creC$ de *E. coli* K1060 daban fenotipos adecuados para la síntesis de compuestos reducidos (Pettinari 2008, Ruiz 2012, Godoy 2016). En parte, el presente trabajo apuntó a validar los reportes previos en una cepa secuenciada y con un genoma uniforme como lo es la BW25113. Hemos podido comprobar varios efectos cepa-dependientes siendo tal vez los más notables los hallados en la cepa $\Delta arcA$. En trabajos anteriores, se pudo demostrar que esta mutante era adecuada para la síntesis de biocompuestos sobre todo en condiciones de baja aerobiosis y a partir de glicerol. En las mutantes $\Delta arcA$ de la cepa elegida para esta tesis pocas diferencias pudieron verse en condiciones de baja tensión de oxígeno, salvo la producción de EtOH en cepas recombinantes creciendo en glucosa. Esto mismo ocurrió con la síntesis de PHB. Pudimos ver consistentemente que, en esta cepa, el consumo de glicerol está atenuado en medio mínimo y, por el contrario, en medio rico y condiciones de aireación completa vimos como aumentó notablemente

el uso de esta fuente de carbono en esta mutante *ΔarcA* recombinante para la síntesis de PDO. Por su parte, en la mutante *ΔcreC* la concentración de EtOH se vió aumentada, mientras que en la cepa K1060 la producción de EtOH en condiciones similares disminuyó (Godoy 2016). El aumento de este alcohol en la cepa mutante de *E. coli* BW25113 fue evidenciado tanto en cepas *ΔcreC* sin modificaciones adicionales, así como recombinantes.

Análisis estadístico

Los diferentes análisis multivariados, que incluyen análisis de componentes principales y por agrupamientos jerárquicos, mostraron patrones específicos para cada mutación a pesar de la amplia regulación ejercida por los factores de transcripción globales y su regulación en forma conjunta de algunos genes diana (Martínez-Antonio y Collado-Vides 2003, Perrenoud 2005). El análisis discriminante también mostró resultados similares. Cabe destacar que, a medida que el número de variables consideradas en los análisis aumenta, la distribución de las cepas resulta más discreta y en grupos claramente diferenciados entre sí. En todos los casos, los dos reguladores globales que mostraron los efectos más distintivos fueron *Δcra* y *ΔarcA*. Este resultado fue constante a lo largo de capítulos I y II de este trabajo.

Teniendo en cuenta los escenarios genéticos y metabólicos creados por la delección de los reguladores globales, las mutantes *Δcra* y *ΔarcA* fueron consideradas en análisis posteriores para la síntesis de compuestos de interés industrial, con el objetivo de poner a prueba la estrategia planteada en esta tesis, que propone la manipulación de la regulación global de *E. coli*, como herramienta biotecnológica para la producción de bioproductos.

Capítulo III

**CAPITULO III. Optimización de la producción de ácido succínico y
1,3-propanodiol**

Prefacio

En los 2 primeros capítulos observamos que la ausencia de los reguladores globales Cra y ArcA tenía efectos profundos sobre el metabolismo de *E. coli*. En este tercero y último capítulo, describiremos las estrategias utilizadas para optimizar la síntesis de compuestos de interés biotecnológico aprovechando los contextos metabólicos generados mediante la manipulación de estos 2 reguladores.

La delección de *cra* tuvo importantes implicancias en el perfil metabólico y la tolerancia a estrés en general. Los distintos análisis estadísticos multivariados utilizados en este trabajo, consistentemente, mostraron un gran impacto causado por la manipulación de Cra, ya que la cepa Δcra fue la que más se distanciaba de la cepa salvaje. Si bien no mostró diferencias significativas en la producción de los distintos compuestos reducidos probados en el capítulo II, tuvo incrementos en la producción específica de EtOH y PDO y, puntualmente como vimos en el capítulo I, un aumento notable en la concentración de succinato, alcanzando casi 1 g.L⁻¹ en cultivos no aireados en tubo sellado, más de 2 veces más la cantidad que alcanzó la cepa salvaje (0,30 g.L⁻¹). Teniendo en cuenta que la cepa Δcra alcanza menor biomasa que la salvaje, la producción específica fue aún mayor. Esto da indicios del potencial de esta cepa para producción de succinato. Para evaluar este potencial implementamos una estrategia tradicional para incrementar la formación de succinato, sobreexpresando genes que codifican para enzimas anapleróticas. Este tipo de enzimas incrementan la disponibilidad de NADH y precursores. Fue necesario optimizar el medio de cultivo ya que sin aireación las mutantes Δcra tenían un crecimiento lento o disminuido, debido al sistema de expresión utilizado. Por último, apuntamos a obtener la mejor combinación de enzimas para maximizar la síntesis de este ácido y evaluamos el impacto de las estrategias empleadas sobre el perfil metabólico.

Por su parte, la delección de *arcA*, aunque no generó diferencias tan drásticas en el perfil metabólico, fue la única cepa que mostró una mayor tolerancia a PDO en los ensayos de tolerancia del capítulo I y por otro lado, fue la cepa que exhibió las mayores diferencias en la síntesis de compuestos reducidos, en particular, PDO, produciendo más de 10 g.L⁻¹ en cultivos en frasco agitado en condiciones de alta aireación a partir de glicerol (la cepa salvaje produjo menos de 5 g.L⁻¹). Cuando hicimos los análisis estadísticos, esta cepa fue la que mostró las desviaciones más marcadas con respecto a la cepa salvaje luego de la mutante Δcra . Por lo tanto, utilizamos una estrategia ya probada en el laboratorio, para intentar potenciar la síntesis de PDO en esta mutante, mediante la

sobreexpresión del gen *phaP*, que codifica una proteína capaz de aumentar la tolerancia a estrés y aumentar la síntesis de solventes en *E. coli*. Luego de ver resultados alentadores, procedimos a realizar cultivos en biorreactor para lograr condiciones más controladas de cultivo y utilizar un medio optimizado de manera de reducir los nutrientes, orientado hacia potenciales aplicaciones industriales. Finalmente, incluimos la cepa Δcra en el estudio de la síntesis de este diol. Esta decisión se basó en algunos indicios ya mencionados, como su capacidad para convertir el sustrato en compuestos de interés, reflejada en una mayor producción específica de EtOH y PDO, con respecto al control (visto en el capítulo II). Estos datos nos llevaron a pensar que era posible que la producción volumétrica de PDO estuviera limitada como consecuencia del aumento en su sensibilidad a estrés (estudiado en el capítulo I). En ese contexto, hipotetizamos que la utilización de algún elemento que aliviara el estrés podría permitir que esta cepa acumulara mayores cantidades de PDO.

Los objetivos de este capítulo pueden resumirse de la siguiente manera:

- Sobreexpresar genes codificantes para enzimas anapleróticas en mutantes Δcra para hallar la mejor combinación de los mismos y mejorar la síntesis de succinato en cultivos no aireados
- Mejorar el crecimiento de mutantes Δcra en condiciones sin aireación, optimizando el medio de cultivo
- Evaluar la efectividad de las estrategias utilizadas analizando el perfil metabólico de las cepas Δcra recombinantes
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión de la proteína protectora PhaP en las cepas Δcra y $\Delta arcA$ recombinantes en relación a la síntesis de PDO en cultivos en medio rico y alta aireación
- Diseñar cultivos en biorreactor para validar los contextos metabólicos adecuados para la formación de PDO, utilizando glicerol como fuente de carbono
- Optimizar el medio de cultivo y las condiciones de alimentación para los cultivos realizados en biorreactor

Parte de los resultados presentados en este capítulo se hallan publicados en el siguiente trabajo:

- Egoburo, D. E., Peña, R. D., Álvarez, D. S., Godoy, M. S., Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2018). Microbial Cell Factories à la Carte: Elimination of Global Regulators Cra and ArcA Generates Metabolic Backgrounds Suitable for the Synthesis of Bioproducts in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84(19), e01337-18.

Optimización de la producción de succinato en mutantes Δcra

Estrategias para la optimización de la producción de succinato

Como se dijo en la introducción, varias estrategias han sido utilizadas para aumentar la producción de succinato en *E. coli*, entre ellas: la introducción de vías heterólogas de organismos productores, mutaciones sistemáticas y la sobreexpresión de enzimas para favorecer la formación de precursores y poder reductor para la síntesis de succinato, entre otras.

Esta última estrategia fue utilizada recientemente en nuestro laboratorio para incrementar la síntesis de succinato en mutantes $\Delta creC$ de la cepa K1060 de *E. coli* (Godoy 2016), cuyo resultado fue un notable aumento de 24 veces en la síntesis del ácido con respecto a la cepa sin modificaciones. Este método implica la sobreproducción de las enzimas carboxilantes Ppc ó la Pck en combinación con la enzima Fdh de *Candida boidinii*. Las enzimas Ppc y Pck actúan mejorando la síntesis de los intermediarios, como PEP, piruvato y ácido fórmico, como se ve en la figura 45. Fdh convierte el ácido fórmico en CO_2 , generando NADH. Esto favorece la disponibilidad de CO_2 , que puede fijarse a través del ciclo de Krebs condensándose con una molécula de PEP y de NADH, necesario para la síntesis de ácido succínico (Figura 45).

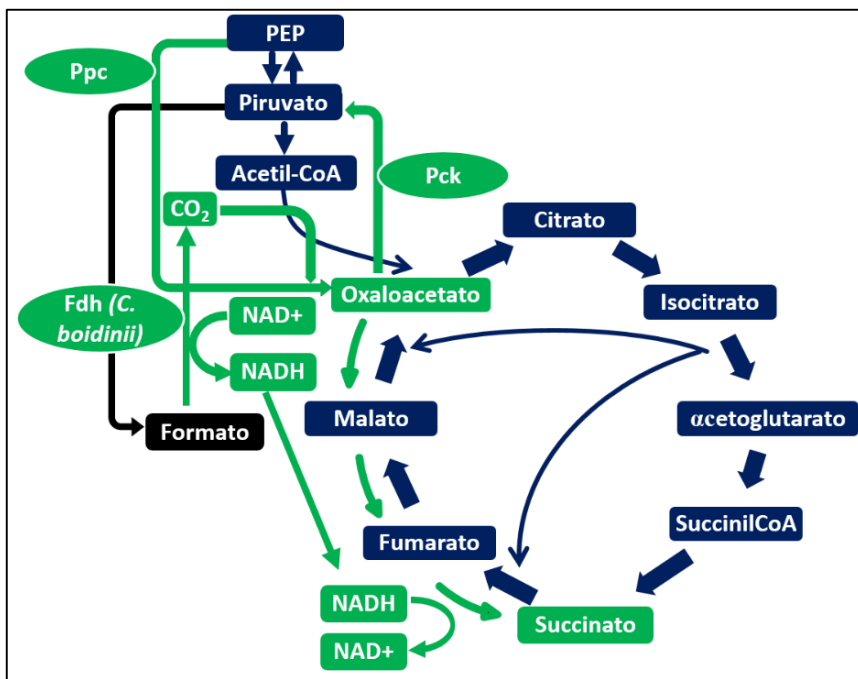


Figura 45. Esquema del metabolismo central del carbono en *E. coli*.

En negro, la producción de ácido fórmico. En azul, la glucólisis y el ciclo de Krebs. En verde se muestran los caminos metabólicos introducidos para optimizar la síntesis de succinato. PEP: fosfoenolpiruvato, Ppc: fosfoenolpiruvato carboxilasa, Pck: piruvato carboxiquinasa, Fdh: formiato deshidrogenasa.

Teniendo en cuenta los resultados previos, decidimos utilizar la misma estrategia en la cepa Δcra , ya que la sobreproducción de las enzimas Ppc, Pck y Fdh podría ser particularmente beneficiosa en

el contexto genético generado por los efectos de la delección de *cra* sobre el metabolismo central, ya que evidenció incrementos en la síntesis de: i) ácido pirúvico, el cual es precursor de ácido fórmico, acetil-CoA, OAA y PEP y ii) ácido fórmico, sustrato de la Fdh para generar exceso de CO₂ y NADH. Procedimos entonces a transformar la cepa mutante Δcra y la cepa control con plásmidos que permiten la sobreexpresión de cada uno de los genes mencionados: pSBF2 (conteniendo a *fdh1*), pEcppc (conteniendo a *ppc*) y pEcpck (conteniendo a *pck*).

Efecto de las enzimas carboxilantes sobre la síntesis de ácido succínico

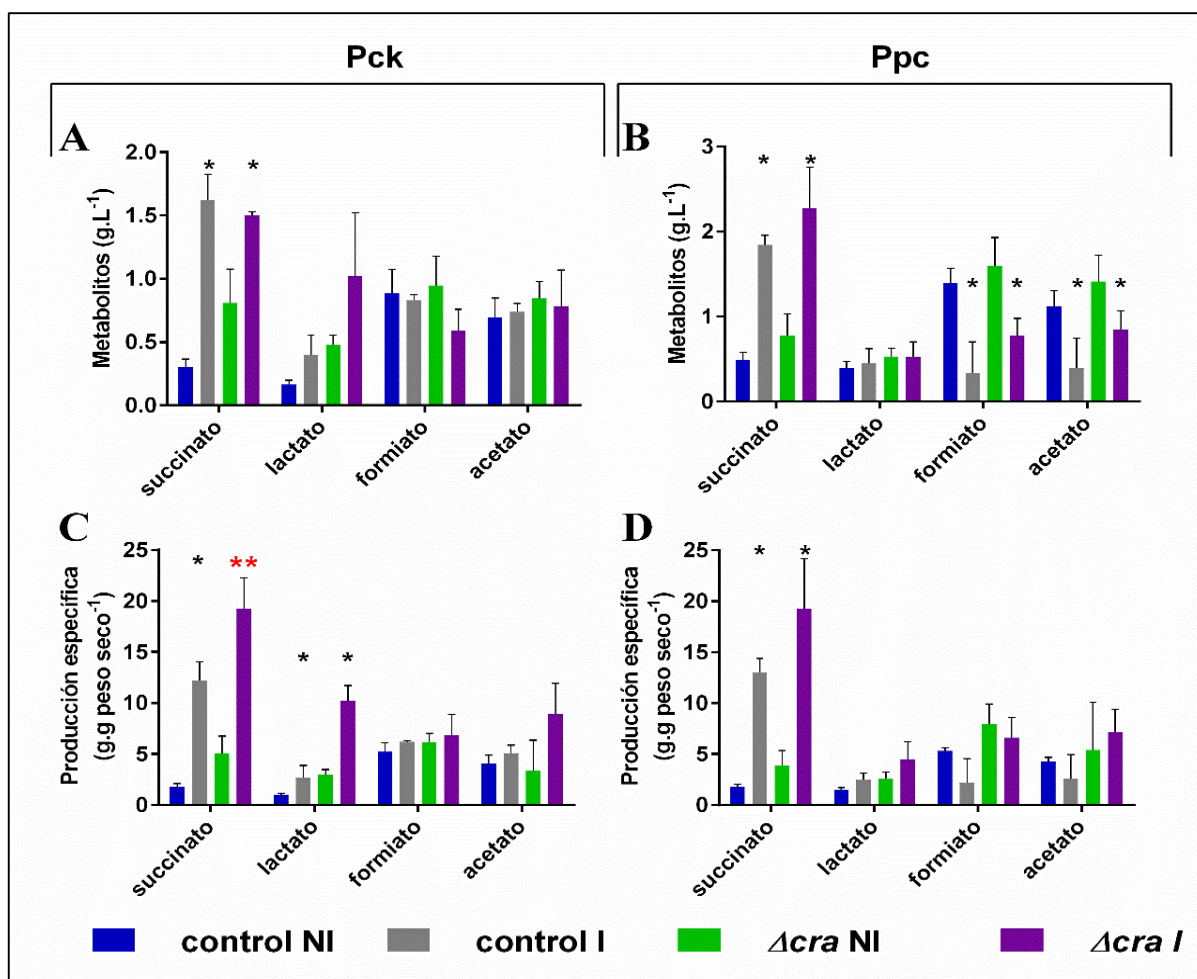


Figura 46. Síntesis de succinato en las cepas control y Δcra modificadas en cultivos sin aireación a 24 hs en M9 glucosa. Se determinó la concentración de metabolitos (A) y la producción específica de todos los ácidos (C) para cultivos sobreexpresando el gen codificante para Pck (contienen el plásmido pEcpck) y la concentración de metabolitos (B) y la producción específica de todos los ácidos (D) para cultivos sobreexpresando el gen codificante para Ppc (contienen el plásmido pEcppc). NI: cultivos en ausencia de inductor. I: indica la inducción de la expresión de los genes en cuestión mediante el agregado de 1 mM de IPTG al medio desde el inicio del cultivo. (*) indica diferencias significativas cuando se compara un cultivo inducido de uno no inducido, de la misma cepa. (**) indica diferencias tanto entre la misma cepa (inducida/no inducida) como diferencias entre la mutante y el control. En ambos casos, se realizó la prueba T de Student (2 colas, $p < 0,05$).

Para evaluar el efecto de la sobreproducción de las enzimas Ppc y Pck, se realizaron cultivos con las cepas transformadas con cada plásmido por separado, y se midió la concentración de ácidos luego de 24 hs en cultivos en tubo sellado, con y sin inducción de los genes introducidos.

Se observó un notable aumento en la síntesis de succinato en ambas cepas cuando indujimos la sobreexpresión de *pck* o *ppc*, comparado con los cultivos de las mismas cepas sin inducción, lo cual nos indicaría que la estrategia funciona. Sin embargo, no vimos diferencias en la concentración de este compuesto entre la cepa salvaje y la mutante cuando se añadió IPTG (Figura 46 A y B). En estos experimentos, el medio de cultivo empleado fue M9 glucosa, el mismo en el que estudiamos el efecto de la delección de reguladores en el perfil metabólico. Al igual que en dichos experimentos, la mutante Δcra logró acumular menor cantidad de biomasa final. Debido a esta disminución en el crecimiento con respecto a la cepa salvaje, calculamos la producción específica para las distintas cepas y pudimos observar que la cepa Δcra sobreexpresando *pck* mostró un aumento significativo comparado a la cepa salvaje en la síntesis de succinato (Figura 46 C). En cuanto al perfil de ácidos, no hubo efectos relevantes causados por la sobreexpresión de *pck* entre la cepa salvaje y la mutante para ningún ácido (Figura 46 A). Cuando la enzima fue la Ppc, tanto la cepa salvaje como la Δcra mostraron leves disminuciones en la concentración de los ácidos fórmico y acético cuando se indujo el sistema (Figura 46 B).

En base a estos resultados, aunque no hubo diferencias volumétricas en la concentración de ácido succínico, podríamos decir que utilizar la enzima Pck resultó más efectiva debido a que la producción específica de la cepa Δcra , sobreexpresando esta proteína, fue mayor que la del control y, además, no tuvo efectos adicionales en el perfil metabólico.

Optimización del medio de cultivo

Luego de estudiar el efecto de las enzimas carboxilantes para redireccionar el flujo de carbono dentro de la célula, el siguiente paso fue analizar el efecto de la sobreexpresión de *fhd1*, que además genera poder reductor, necesario para la síntesis de ácido succínico. Al intentar utilizar esta estrategia observamos que la cepa $\Delta cra/pSBF2$ (conteniendo el gen *fdh1*) no lograba crecer cuando la expresión era inducida mediante IPTG en medio **M9** (Figura 47 A). Además, como se mencionó en el experimento anterior, las cepas salvaje y Δcra transformadas con alguno de los plásmidos que permiten la sobreproducción de las enzimas Ppc o Pck disminuían significativamente la formación de biomasa cuando la sobreexpresión de los genes era inducida por el agregado de IPTG, con respecto al cultivo no inducido. Este efecto era aún más notorio en la cepa Δcra (Figura 47). Sabiendo

que la ausencia de Cra reprime la vía de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs (Yao 2013) y, como vimos en el capítulo I, aumenta la sensibilidad a estrés, podría ser que la duplicación de los plásmidos y la sobreexpresión de genes (el plásmido pSBF2 es de alto número de copias) sumado a condiciones sin aireación (donde la generación de energía es menor, comparado a condiciones de mayor disponibilidad de O₂) y medio mínimo, afectasen severamente el crecimiento.

Entonces decidimos utilizar LB suplementado con glucosa en lugar de medio mínimo M9, logrando obtener una biomasa considerable en ambas cepas, incluso la Δcra /pSBF2 (Figura 47 B). De la misma manera, cuando realizamos cultivos de las cepas transformadas con la combinación de los plásmidos pEcpck y pSBF2 en medio LB, también se obtuvo un buen crecimiento para las cepas control y Δcra , sin la disminución causada por la inducción de los genes, como ocurría en M9. Sin embargo, surgió una dificultad para cuantificar el succinato en estas cepas mediante HPLC-UV, ya que componentes del medio complejo son capaces de absorber a 210 nm, y esto resultó en una superposición con las señales de los ácidos orgánicos. Esto no permitió la determinación del succinato mediante la técnica utilizada en el laboratorio.

Finalmente, decidimos utilizar un medio semidefinido, con la matriz simple del medio M9, pero con el agregado de tiamina, extracto de levadura 0,5 g.L⁻¹ y solución de trazas (**Medio M9 TE**). Este medio debería evitar posibles deficiencias en vitaminas y mejorar la acumulación de biomasa a partir de precursores disponibles en el extracto de levadura. Aunque la biomasa final luego de 24 hs fue menor que la alcanzada en LB (Figura 47 C), se logró un crecimiento uniforme entre todas las cepas. Además, el agregado de una pequeña cantidad de extracto levadura no interfirió con la detección de metabolitos por HPLC. Debido a ello, se eligió este medio para la optimización de la síntesis de succinato. La composición de cada medio utilizado se muestra en la tabla 17.

Composición	M9	LB	M9 TE
Extracto de levadura	-	5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
Tryptona	-	10 g.L ⁻¹	-
NaCl	0,5 g.L ⁻¹	5 g.L ⁻¹	0,5 g.L ⁻¹
Tiamina	-	-	5 µg.L ⁻¹
Trazas (MyM)	-	-	Trazas de Fe, Mn, Co, Cu y Zn

Tabla 17. Composición de los medios utilizados durante la optimización del crecimiento de cepas productoras de succinato.

MyM: ver materiales y métodos para la composición de la solución.

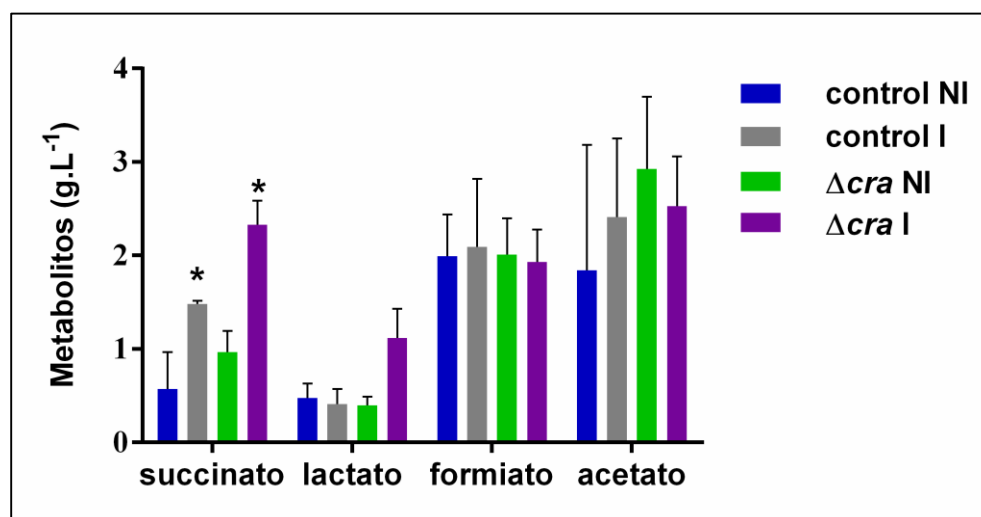
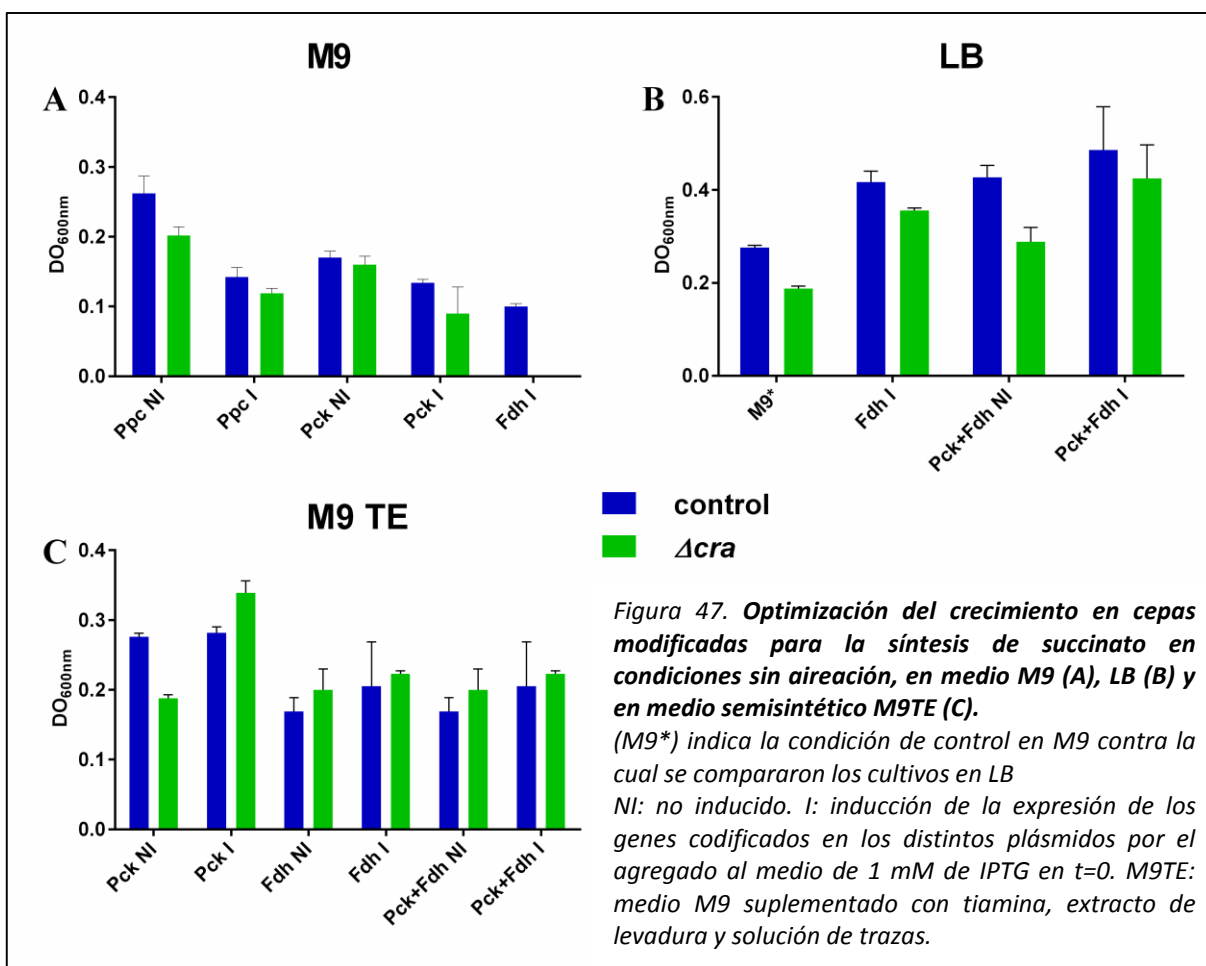


Figura 48. Perfil metabólico de las cepas salvaje y Δcra en medio M9TE en condiciones sin aireación, que contienen el plásmido pSBF2, el cual contiene el gen para la sobreexpresión de fdh1 de C. boidini. NI: cultivos no inducidos. I: indica la inducción de la expresión de los genes en cuestión mediante el agregado de 1 mM de IPTG al medio desde el inicio del cultivo. (*) indica diferencias significativas cuando se compara un cultivo inducido de uno no inducido, de la misma cepa (prueba T de Student 2 colas, $p < 0,05$).

Efecto de la sobreexpresión de *fdh1*

Cuando la expresión de *fdh1* se indujo en la cepa control y la mutante Δcra , utilizando el medio semisintético M9TE, se alcanzaron concentraciones mayores con respecto al uso de enzimas carboxilantes solamente, pero no hubo diferencias significativas entre la cepa salvaje y la mutante (Figura 48), al igual que en los ensayos anteriores. La sobreproducción de la enzima Fdh no afectó el perfil metabólico de ninguno de los cultivos, como sucedió también con las enzimas carboxilantes.

Combinación de las enzimas Pck y Fdh

En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio, la combinación de las enzimas Ppc y Fdh fue la estrategia que resultó más eficiente para aumentar la síntesis de succinato en la cepa mutante $\Delta creC$ de *E. coli* K1060 (Godoy 2016).

En este trabajo, ninguna de las enzimas por separado logró aumentar la síntesis de succinato. Por lo tanto, decidimos utilizar una combinación de las mismas. La enzima carboxilante que mostró tener un efecto diferencial en mutantes Δcra , y sólo en cuanto a la producción específica, fue la enzima Pck. Por lo tanto, transformamos la cepa control y la cepa mutante con los plásmidos pEcpck y pSBF2, para permitir la sobreproducción simultánea de estas proteínas y evaluar su efecto en la formación de succinato. La co-expresión de los genes codificantes para Pck y Fdh1 condujo a un aumento de succinato tanto en la Δcra como en las cepas de tipo salvaje. Esto ya había sido evidenciado en los experimentos anteriores con una sola de las enzimas, pero esta vez, el aumento fue mucho más marcado en la cepa mutante, logrando una diferencia de casi 100% en la concentración de succinato en comparación con la cepa salvaje en cultivos en M9 TE no aireados después de 24 hs ($2,85 \pm 0,58 \text{ g.L}^{-1}$ y $1,54 \pm 0,21 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente) (Figura 49A). La inducción de las enzimas no produjo cambios significativos en los perfiles metabólicos de los recombinantes, aparte del aumento en la síntesis de succinato (Figura 49B), con lo cual la implementación de esta combinación resultó exitosa en el contexto genético de Δcra para la producción de succinato.

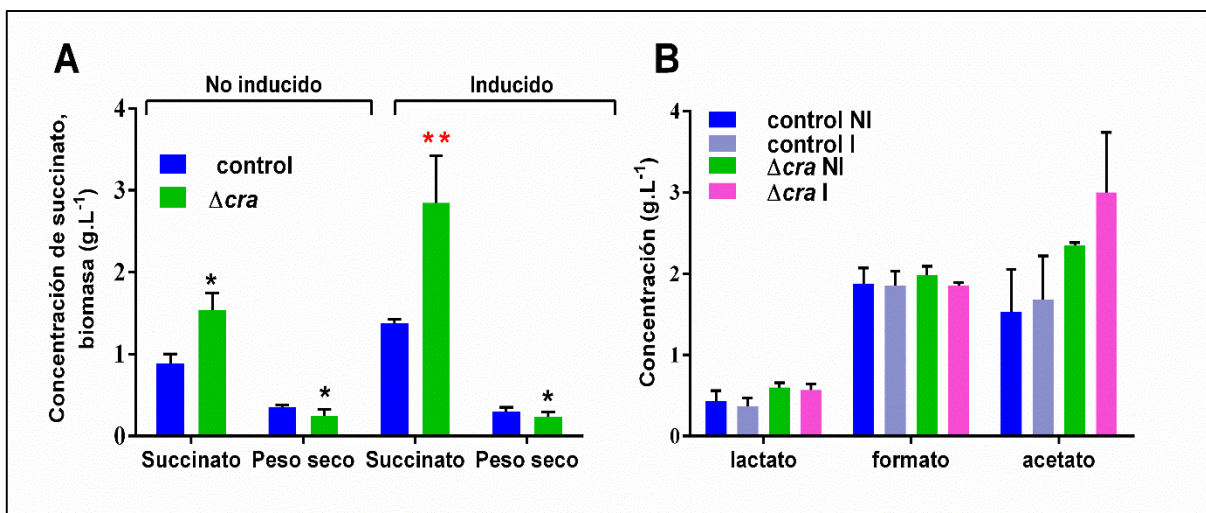


Figura 49. Producción de succinato (A) y perfil metabólico (B) de *E. coli* BW25113 (cepa salvaje) y su mutante Δ cra.

Ambas cepas están transformadas con los plásmidos pSBF2 (que lleva a *fdh1* de *C. boidinii*) y pEcpck (que lleva a *pck* de *E. coli*). Los cultivos se realizaron en medio M9TE suplementado con glucosa 5 g.L⁻¹ en condiciones sin aireación en tubo sellado. I: expresión de *fdh1* y *pck* inducida por IPTG 0.5 mM añadido al cultivo desde el inicio. (*) indica diferencias significativas cuando se compara un cultivo inducido de uno no inducido, de la misma cepa. (**) indica diferencias tanto entre la misma cepa (inducida/no inducida) como diferencias entre la mutante y el control. En ambos casos, la estadística se realizó mediante la prueba T de Student (2 colas, $p < 0,05$).

Discusión y conclusiones parciales

La mutante Δ cra había mostrado inicialmente, en su perfil de ácidos orgánicos en condiciones de baja aireación, un aumento importante en la síntesis de succinato (cerca de 3 veces más que la cepa salvaje). Cuando se realizaron cultivos sin aireación, la cepa llegó a producir cerca de 1 g.L⁻¹ en cultivos en tubo sellado en 24 hs de cultivo (Capítulo I). La sobreproducción de Pck provocó un aumento significativo en la producción específica de succinato, mientras que no se detectaron diferencias en el caso de la enzima Ppc. Por su parte, Fdh por si sola tampoco generó un aumento en succinato. Finalmente, tras combinar Pck y Fdh, y tras optimizar el medio de cultivo utilizado para estos ensayos, logramos obtener casi 3 g.L⁻¹ de succinato, lo cual representa un aumento de casi el 100% con respecto a la cepa control. Se sabe que en *E. coli*, la enzima carboxilante más activa es la Ppc, debido a que Pck es inhibida por múltiples factores, entre ellos el uso de glucosa como fuente de carbono y, además, solo está activa en ausencia de Ppc. Suponemos que al sobreexpresar *pck* en un sistema plasmídico regulable por IPTG, enzima Pck se encuentra activa y, en estas condiciones, catalizaría la conversión de OAA en piruvato proveyendo precursores para la formación de succinato (Jiang 2017), y al mismo tiempo generaría poder reductor necesario para la síntesis de succinato.

Esta mayor disponibilidad de NADH se vería magnificada, adicionalmente, por la actividad de Fdh. Esto último es importante, ya que no vimos un aumento en la síntesis de otros compuestos reducidos en este contexto genético y su cociente NADH/NAD⁺ no resultó distinto de los valores hallados en la cepa control. Es probable que, en esta cepa, la disponibilidad de poder reductor sea un cuello de botella para síntesis de compuestos reducidos, como el PDO, EtOH y el succinato. Se debe tener en cuenta que estos resultados se obtuvieron sin aireación y en un medio semidefinido de cultivo, condiciones compatibles con futuras aplicaciones en procesos con bajos requerimientos energéticos.

Un estudio reciente originó diferentes variantes de Cra, mediante la técnica de PCR con una DNA polimerasa que propicia errores. Una de estas proteínas modificadas fue introducida en una cepa de Δpfl , Δldh de *E. coli*, y el resultado fue un aumento significativo en la síntesis de succinato debido a la activación constitutiva de los genes *aceBAK* (Zhu 2016). Aunque la proteína Cra modificada podría afectar los flujos metabólicos de una manera diferente en comparación con la ausencia del regulador, el efecto sobre la producción de succinato de ambos tipos de manipulaciones apoya la noción de que Cra es un regulador clave que tiene un efecto importante en la síntesis de este compuesto de alto valor agregado.

Estudio de la optimización de la síntesis de PDO

Los resultados mostrados en las secciones previas indicaron que la cepa $\Delta arcA$ es la más adecuada para la síntesis de PDO cuando se creció en medio rico y en condiciones de alta aireación (Capítulo II). Esta mutante mostró un mayor rendimiento y consumo de glicerol en estas condiciones y una mayor tolerancia a PDO que cualquiera de las otras cepas (Capítulo I). Debido a ello, decidimos optimizar la producción de PDO en las mutantes $\Delta arcA$ de *E. coli* BW25113.

Por otro lado, la mutante Δcra mostró una baja producción volumétrica pero una producción específica más alta de PDO en comparación con la cepa parental (Capítulo II). En este caso, la síntesis de PDO podría estar limitada por una mayor sensibilidad a condiciones de cultivo estresantes o inhibidores metabólicos, dado que esta cepa mutante mostró una disminución en la tolerancia a la mayoría de los compuestos tóxicos probados. En este contexto, planteamos la hipótesis de que una estrategia que mejorara la respuesta a estrés de esta cepa podría tener un efecto positivo en la síntesis de PDO.

Fundamentos de la estrategia

Como se dijo en la introducción, se han utilizado varios enfoques diferentes para superar los diferentes problemas o limitantes en el desarrollo de cepas sobreproductoras de compuestos de interés industrial. En cuanto al estrés o problemas de tolerancia, se han implementado estrategias como los experimentos de evolución, en los que las cepas resistentes se seleccionan mediante presión selectiva utilizando cantidades crecientes del bioproducto (Nikel 2010), pero también otros enfoques. Por ejemplo, la expresión de chaperonas se ha empleado para potenciar la tolerancia bacteriana a diversos compuestos como el EtOH en varias cepas (Nicolau 2010). Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado el efecto protector de PhaP, una proteína asociada a gránulos de PHB de *Azotobacter* FA8 sp, contra varios tipos de estrés (Mezzina 2014). Más recientemente, se demostró que PhaP mejora la tolerancia a los biocombustibles y mejora la producción de EtOH y PDO en *E. coli* (Mezzina 2017). En vista de estos resultados, *phaP* se sobreexpresó en los mutantes $\Delta arcA$ y Δcra de la colección Keio para probar su capacidad de mejorar la producción de PDO.

Efecto de la sobreexpresión de *phaP* sobre la síntesis de PDO

El primer paso fue probar la eficiencia del sistema de expresión de *phaP*. En primer lugar, utilizamos el plásmido pADP2, el cual contiene el gen *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8 bajo el promotor *lac* (Mezzina 2017). Este plásmido es incompatible con el plásmido que contiene el operón de la vía de síntesis del diol, utilizado hasta ahora, ya que ambos son plásmidos pBBR1. Por este motivo, cambiamos el plásmido pBBR1MCS2::*dha* (Figura 50 A) por plásmido pSEVA221::*dha* (Mezzina 2017), el cual contiene el mismo operón utilizado en los experimentos anteriores pero clonado en uno de los plásmidos de la colección SEVA (por *Standard European Vector Architecture*). Cabe mencionar que el operón *dha* contiene su propio regulador endógeno, con lo cual la síntesis de PDO es regulable por el agregado de glicerol, que actúa como sustrato de la vía, y por el agregado de vitamina B12, ya que una de las enzimas de la vía es B12-dependiente (Figura 50 B).

Desafortunadamente, cuando utilizamos el plásmido pSEVA221::*dha*, una notable disminución en la producción de PDO fue detectada con respecto a las cepas transformadas con el pBBR1::*dha* (Figura 38). Atribuimos esta diferencia al cambio de origen de replicación. Por esto decidimos mantener el plásmido de expresión de los genes *dha* anterior, y clonar el gen *phaP* en otro plásmido compatible, obteniendo así el pPhaP328, un plásmido de mediano número de copias y con el gen de interés bajo el control del promotor Pm, inducible por ácido m-toluico (Figura 37 C).

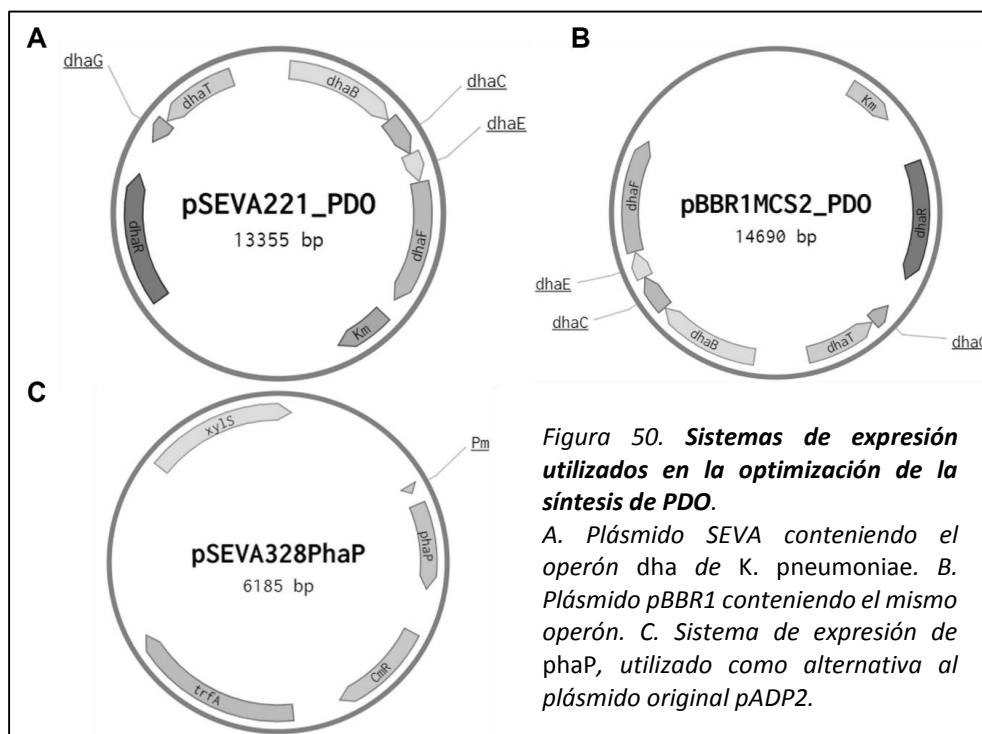


Figura 50. Sistemas de expresión utilizados en la optimización de la síntesis de PDO.
A. Plásmido SEVA conteniendo el operón *dha* de *K. pneumoniae*. B. Plásmido pBBR1 conteniendo el mismo operón. C. Sistema de expresión de *phaP*, utilizado como alternativa al plásmido original pADP2.

Las cepas transformadas con el plásmido pBBR1::*dha* y el pPhaP328, simultáneamente, en ausencia de inductor mostraron valores de PDO similares a los obtenidos en las cepas conteniendo solo el plásmido pBBR1::*dha* (Figura 51), con lo cual esto nos indicó que este sistema era adecuado, ya que no afectaba negativamente el crecimiento.

El siguiente paso fue determinar si la presencia de PhaP aumentaba la síntesis del diol. Con el agregado de inductor 0,1 mM no se observaron diferencias, salvo para la cepa salvaje en la que la concentración de PDO aumentó de $4,71 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ hasta $6,57 \pm 1,20 \text{ g.L}^{-1}$ (Figura 52). Por el contrario, para la mutante Δcra hubo una disminución significativa de PDO, lo cual podría deberse a una disminución en la biomasa final para estas mutantes con respecto a la cepa salvaje (efecto similar al de la transformación de las cepas con plásmidos para la síntesis optimizada de succinato). Esto indicaría que el efecto protector de PhaP no sería suficiente para mejorar la síntesis del compuesto. Dado que no vimos un aumento en la síntesis de diol en las mutantes $\Delta arcA$ ni Δcra , probamos aumentar la inducción, agregando una concentración final de 0,5 mM de ácido toluico, con el fin de analizar si la expresión de *phaP* podría ser insuficiente, ya que el plásmido donde se clonó es de bajo número de copias.

Aunque la sobreexpresión de *phaP* provocó un incremento significativo en la producción de diol en la cepa Δcra , este efecto fue inesperadamente menos importante que el efecto observado en la cepa salvaje (Figura 52). Esto podría indicar que, a pesar de la mayor sensibilidad de las mutantes Δcra a diversos tipos de estrés, el bajo rendimiento para la síntesis de PDO podría estar relacionado con otros factores. Estos resultados sugieren que la ausencia de este regulador mutante global no sería favorable para la síntesis del diol. Por esta razón, decidimos no seguir utilizando esta mutante en los experimentos subsiguientes.

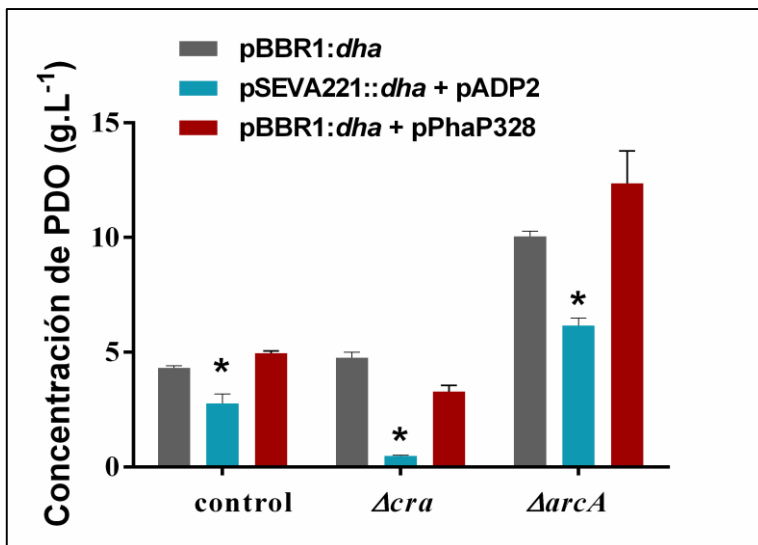


Figura 51. Comparación de la síntesis de PDO obtenido en presencia de los diferentes plásmidos de expresión.

En todos los casos, la producción de PhaP no fue inducida para comparar el efecto de co-transformación de las cepas con 2 plásmidos distintos. (*) indica diferencias significativas entre los diferentes sistemas de expresión para una misma cepa dada (Prueba T de Student, $p < 0,05$).

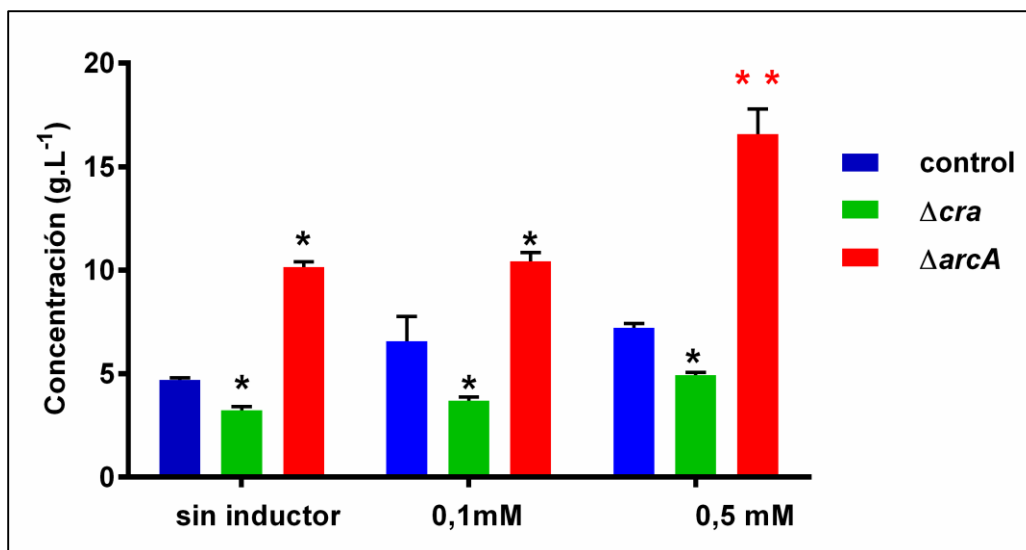


Figura 52. Efecto de la sobreproducción de PhaP sobre la síntesis de PDO.

Todas las cepas contenían los plásmidos pBBR1MCS-2: dha y pPhaP328 (que portan phaP de *Azotobacter FA8* sp.). La expresión de phaP se indujo mediante la adición de ácido m-toluico en las concentraciones indicadas cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial temprana ($DO = 0,8$). (*) indica diferencias significativas cuando se compara una misma cepa en los diferentes sistemas de inducción. (**) indica diferencias tanto entre la misma cepa (inducida/no inducida) como diferencias entre la mutante y el control. En ambos casos, la estadística se realizó mediante la prueba T de Student (2 colas, $p < 0,05$).

En el caso del mutante $\Delta arcA$, la sobreexpresión de PhaP con 0,5 mM de inductor dio como resultado un aumento significativo en la producción de PDO, tanto en comparación con la cepa mutante sin expresar phaP como también con la de tipo salvaje expresando la phasina (Figura 52). La cantidad final de PDO producida por la cepa $\Delta arcA$ en presencia de PhaP fue de $17 \pm 1 \text{ g.L}^{-1}$ (vs. $7,4 \text{ g.L}^{-1}$ de la

cepa control), con un aumento significativo del rendimiento, que fue de $0,73 \pm 0,01$ mol.mol⁻¹ (Figura 52, Tabla 18). De la misma manera, fue marcado el aumento del consumo del glicerol y la producción específica para la mutante $\Delta arcA$, comparada con el resto de las cepas (Tabla 18). Estos datos indican que los efectos beneficiosos de PhaP potenciaron aún más los efectos metabólicos de la ausencia de ArcA, logrando un aumento incluso mayor en la producción del diol a partir de glicerol, comparado con el control.

Cepas	Rendimiento (mol PDO.mol gli ⁻¹)	Consumo de glicerol (g.L ⁻¹)	Producción específica (mol PDO.g peso seco ⁻¹)
Control sin inducción	$0,39 \pm 0,01$	$16,0 \pm 0,4$	$0,62 \pm 0,03$
$\Delta arcA$ sin inducción	$0,46 \pm 0,02$ *	32 ± 4 *	$1,40 \pm 0,15$ *
control + inductor 0,5 mM	$0,44 \pm 0,01$	$20,0 \pm 0,2$	$0,92 \pm 0,03$
$\Delta arcA$ + inductor 0,5 mM	$0,73 \pm 0,01$ **	28 ± 2 *	$1,80 \pm 0,12$ *

Tabla 18. Parámetros de producción de PDO en mutantes $\Delta arcA$.

Los cultivos se crecieron en LB suplementado con glicerol 30 g.L⁻¹ en frascos agitados en condiciones de alta aireación durante 24 hs. Los resultados representan el valor medio \pm desviación estándar de triplicados de al menos dos cultivos independientes. Las cepas utilizadas fueron E. coli BW25113 como control y su derivado $\Delta arcA$. Todas las cepas contenían los plásmidos pBBR1MCS-2 :: dha (que portan los genes para la síntesis de PDO) y pPhaP328 (que portan phaP de Azotobacter FA8 sp.). La expresión de phaP se indujo mediante la adición de ácido m-toluico 0,5 mM cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial temprana (DO = 0,8). (*) indica diferencias significativas cuando se compara una misma cepa en cultivos inducidos y no inducidos. (**) indica diferencias tanto entre la misma cepa (inducida/no inducida) como diferencias entre la mutante y el control. En ambos casos, la estadística se realizó mediante la prueba T de Student (2 colas, $p < 0,05$).

Producción de PDO en cultivos en biorreactor

Teniendo en cuenta los resultados prometedores obtenidos con el mutante $\Delta arcA$ en cuanto a la síntesis de este compuesto de alto interés biotecnológico, se analizó la síntesis de PDO en condiciones de cultivo más controladas utilizando un biorreactor a escala de laboratorio.

El primer paso fue validar lo que vimos en esta cepa en medio complejo bajo condiciones de alta aireación. Utilizando un modo de cascada, mantuvimos el nivel de O₂ disuelto por encima del 20% durante todo el cultivo y utilizamos glicerol como fuente de carbono. Probamos diferentes tiempos de cultivo y distintas estrategias de alimentación.

Optimización de la estrategia de alimentación: lote vs. lote repetido

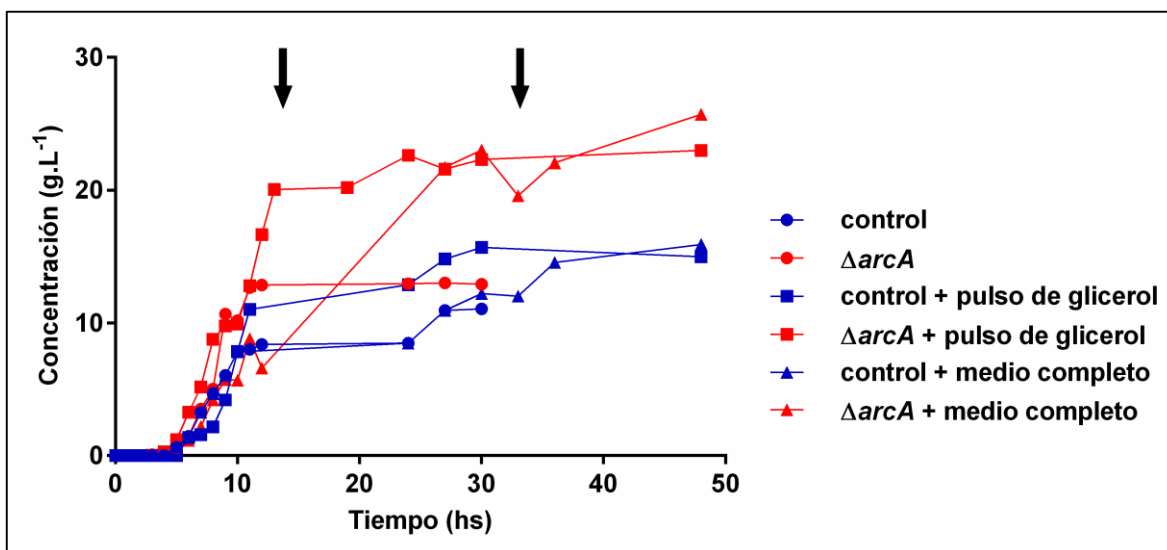
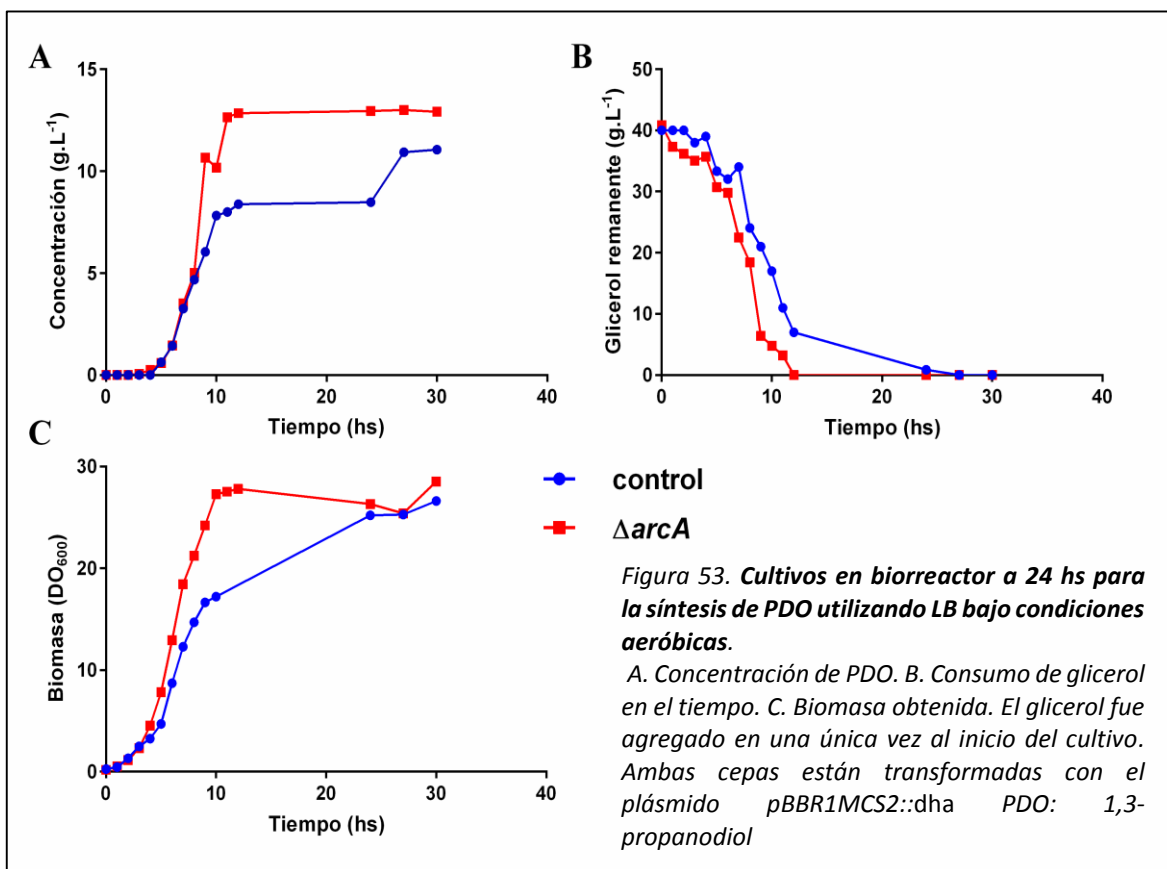


Figura 54. Optimización de la estrategia de alimentación con glicerol como fuente de carbono para la síntesis de PDO en cultivos a 24 y 48 hs.

Pulso de glicerol: se alimentó el cultivo con una solución madre de glicerol. Medio completo: se realizó el agregado de glicerol en medio concentrado LB 5X. Los tiempos de agregado de nutrientes están indicados con flechas negras. Ambas cepas están transformadas con el plásmido pBBR1MCS2::dha.

En primer lugar, realizamos cultivos en lote por 24 hs en medio LB utilizando una concentración de 40 g.L⁻¹ de glicerol inicial, de manera de validar lo que habíamos visto durante los experimentos en frasco agitado del capítulo II. A tiempo final, las concentraciones de PDO fueron similares para la cepa salvaje y la mutante, a diferencia de lo que había sucedido anteriormente. Sin embargo, hubo aumentos importantes en las cinéticas de producción del diol (Figura 53 A), de consumo de glicerol (Figura 53 B) y de crecimiento (Figura 53 C). Las mutantes *ΔarcA* acumularon más de 12 g.L⁻¹ a las 10 hs de iniciado el cultivo mientras que la cepa salvaje alcanzó estas concentraciones a las 24 hs, evidenciado una clara diferencia en la productividad. La misma tendencia se observó para el crecimiento de las 2 cepas. El consumo del glicerol fue del 100% en ambas cepas pero sucedió antes en el tiempo en la cepa mutante. Estos nos indica que la fuente de carbono fue limitante y puede explicar por qué la síntesis de PDO no fue diferente en ambas cepas. A pesar de no observarse diferencias en la producción volumétrica de solvente entre los 2 cultivos, estos resultados confirman el potencial de la cepa *ΔarcA* para la síntesis de PDO.

A partir de estos resultados se decidió extender el tiempo de cultivo y agregar glicerol al medio a medida que este se consumía. De esta manera, realizamos cultivos en el biorreactor a 48 hs en medio LB con el agregado inicial de 40 g.L⁻¹ de glicerol, agregando glicerol hasta llegar a la concentración inicial en el medio de cultivo cada vez que disminuía su concentración por debajo de 5 g.L⁻¹. Con este nuevo protocolo, pudimos obtener una alta producción de PDO, sobre todo en la cepa mutante, que llegó a 23 g.L⁻¹, lo que representa un aumento de más del 70% con respecto a la cepa salvaje (Figura 54). En cuanto a la biomasa, esta no fue muy diferente a lo obtenido en los cultivos a 24 hs, lo cual nos indica que el glicerol se usó efectivamente en la conversión a PDO (Figura 54). Estos resultados demuestran el potencial de la cepa *ΔarcA* para la síntesis de PDO utilizando lote repetido.

Dado que el aumento en la síntesis de PDO fue consistente tanto en frasco agitado como en biorreactor, nos preguntamos si podría haber algún otro limitante en el medio de cultivo como vitaminas o fuente de nitrógeno, ya que hasta el momento solo agregábamos al cultivo glicerol concentrado. Para investigar esto implementamos el agregado de glicerol en pulsos pero con medio concentrado, para agregar precursores, fuente de nitrógeno y vitaminas simultáneamente con la fuente de carbono. Los resultados de la figura 54, nos muestran que no hubo grandes efectos por el agregado de nutrientes extra a tiempo final, lo que nos indica que los cultivos no están limitados en la producción de PDO por otros factores que no sea la fuente de carbono. Vale la pena mencionar, como se ve en la figura 54, que cuando la alimentación se hizo por el agregado de medio completo,

ambas cepas disminuyeron la velocidad de síntesis de PDO en 48 hs, con respecto a las cepas alimentadas sólo con glicerol. Podría ocurrir que el agregado extra de componentes del medio junto con los pulsos de glicerol, favorezca la síntesis de otros metabolitos, en detrimento de la formación de diol.

Optimización del medio de cultivo: medio SDM

Ensayos preliminares en frasco agitado

Antes de probar el efecto de PhaP sobre la producción de PDO en biorreactor debimos poner a punto el medio de cultivo. EL LB no resulta adecuado para el desarrollo de procesos microbianos potencialmente escalables, debido a su compleja composición (la cual puede variar de acuerdo al lote) y por su costo. Nuestro primer enfoque fue analizar, entonces, un medio semidefinido más compatible con aplicaciones futuras.

Debido a lo observado previamente en experimentos descritos en el capítulo II, en los que no se hallaron diferencias significativas con respecto a la cepa control cuando se estudió la producción de PDO en medio mínimo, fue necesario evaluar el impacto en la producción de diol al utilizar un medio semisintético, menos rico que los medios complejos.

Para esto, optamos por un medio comúnmente utilizado como base en los procesos de cultivo en biorreactor: el M9. El medio fue suplementado con 5 g.L⁻¹ de extracto de levadura, el cual funciona como fuente de nitrógeno orgánico, en forma de aminoácidos y péptidos, y vitaminas. Además, agregamos cloruro de amonio, como fuente de nitrógeno inorgánico en una concentración final de 1 g.L⁻¹. Este medio fue denominado SDM. Para probar si este medio era adecuado, se realizaron cultivos en frasco agitado durante 24 hs en las condiciones óptimas para la producción de PDO. Finalmente, estudiamos el efecto de PhaP transformando las cepas con el plásmido pPhaP328, induciendo la expresión de *phaP* en fase exponencial temprana por el agregado de 0,5 mM de ácido m-toluico, concentración que pudimos establecer en las secciones anteriores.

El uso de medio SDM provocó una ligera reducción en los títulos de diol para ambas cepas como se puede ver en la figura 55, sin embargo, los cultivos de la cepa *ΔarcA* nuevamente mostraron un

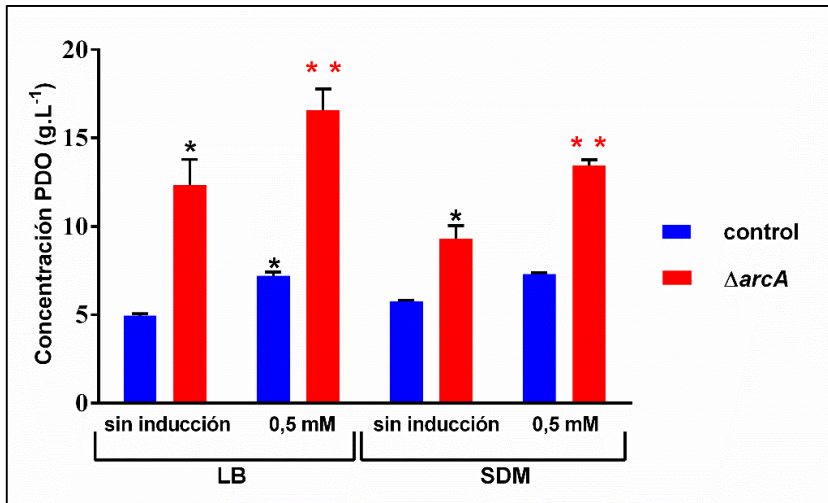


Figura 55. Efecto de PhaP sobre la producción de PDO en medio semidefinido.

E. coli BW25113 (control) y la mutante $\Delta arcA$, todos ellos con los plásmidos pBBR1MCS-2::dha y pPhaP328, se hicieron crecer en frascos agitados utilizando medios LB o SDM suplementados con 30 g.L⁻¹ de glicerol en condiciones de alta aireación durante 24 hs. La expresión de PhaP se indujo con la adición de ácido *m*-toluico 0,5 mM cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial temprana (DO_{600}

= 0,8). PDO: 1,3-propanodiol. SDM: medio semidefinido. cultivos crecidos en presencia de inductor. (*) indica diferencias significativas cuando se comparan cepas mutantes y cepa de tipo salvaje. (**) indica diferencias tanto entre la misma cepa (inducida/no inducida) como diferencias entre la mutante y el control. En ambos casos, la estadística se realizó mediante la prueba T de Student.

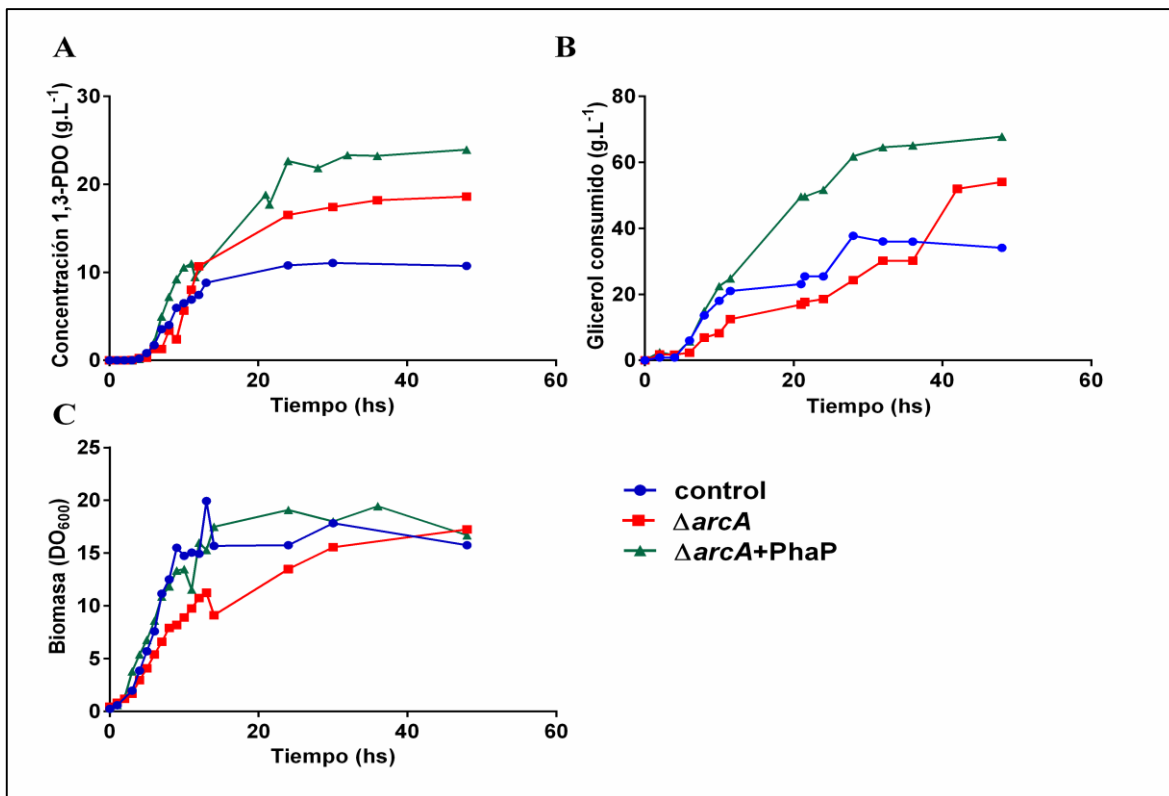


Figura 56. Producción de PDO en mutantes $\Delta arcA$ y el efecto de PhaP en la síntesis de diol.

E. coli BW25113 y $\Delta arcA$ conteniendo los plásmido pBBR1MCS-2::dha (cepas control y $\Delta arcA$) y $\Delta arcA$ que contiene ambos plásmidos pBBR1MCS-2::dha y pPhaP328 ($\Delta arcA$ + PhaP) se crecieron en SDM suplementado con glicerol 30 g.L⁻¹ en biorreactor en condiciones de aireación total durante 48 hs. La expresión de phaP se indujo mediante la adición de 0,5 mM de ácido *m*-toluico en la fase exponencial temprana. Se presentan datos representativos de dos fermentaciones independientes. (A) producción de PDO, (B) glicerol consumido y (C) crecimiento. PDO: 1,3-propanodiol. SDM: medio semidefinido. El plásmido pBBR1MCS-2::dha contiene el operón dha de *K. pneumoniae*. Plásmido pPhaP328: contiene phaP de *Azotobacter* FA8 sp.

incremento notable en PDO de más de 60% en comparación con la cepa salvaje (Figura 55). Cuando *phaP* fue inducido vimos un aumento de más del 80% en la síntesis de este compuesto, muy similar a lo que ocurría en medio complejo. Podemos decir que la optimización del medio resultó adecuada y pudimos apreciar el efecto potenciador de PhaP, en particular en el contexto metabólico generado en las mutantes $\Delta arcA$, ya que en la cepa control la expresión del sistema no surtió efectos apreciables sobre la síntesis del diol.

Cultivo en lote repetido en cepas $\Delta arcA$ y $\Delta arcA$ +PhaP

Finalmente, como última etapa en la optimización, se realizaron cultivos en lote repetido de las cepas salvaje, $\Delta arcA$ y $\Delta arcA$ expresando *phaP* en biorreactor durante 48 hs utilizando el medio SDM. La concentración de glicerol se restauró a 30 g.L⁻¹ cada vez que alcanzó niveles inferiores a 5 g.L⁻¹. De esta manera buscamos validar lo que encontramos en los cultivos de frasco agitado utilizando el medio semidefinido que diseñamos. Bajo estas condiciones, la cepa control alcanzó 11 g.L⁻¹ de PDO con una productividad volumétrica de 0,24 ± 0,02 g.L⁻¹.h⁻¹, mientras que el cultivo de $\Delta arcA$ produjo un 73% más de PDO, logrando 19 g.L⁻¹ y una productividad de 0,38 ± 0,01 g.L⁻¹.h⁻¹ (Fig. 56A, Tabla 15).

Cepas	μ_{max}^a (h ⁻¹)	Rendimiento (mol PDO.mol gli ⁻¹)	Productividad (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Producción específica (g.L ⁻¹ g peso seco ⁻¹ .h ⁻¹)	Consumo específico (g.L ⁻¹ g peso seco ⁻¹ .h ⁻¹)
Control	0,39 ± 0,02	0,40 ± 0,06	0,24 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,18 ± 0,01
$\Delta arcA$	0,27 ± 0,02	0,41 ± 0,04	0,38 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,26 ± 0,03
$\Delta arcA$ + PhaP	0,34 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,11 ± 0,01	0,31 ± 0,02

Tabla 19. Cultivos en lote repetido de las mutantes $\Delta arcA$ en medio semidefinido expresando *phaP*. Los cultivos se crecieron en SDM suplementado con glicerol 30 g.L⁻¹ en biorreactor en condiciones de alta aireación durante 48 hs. Los resultados representan el valor medio ± desviación estándar de mediciones duplicadas de al menos dos cultivos independientes. Las cepas utilizadas fueron *E. coli* BW25113 como control (tipo salvaje) y su mutante isogénica $\Delta arcA$. Todas las cepas albergaban el plásmido pBBR1MCS-2 :: dha (que porta los genes para la síntesis de PDO). En la cepa $\Delta arcA$ + PhaP conteniendo el plásmido pPhaP328, la expresión de *phaP* se indujo mediante la adición de 0,5 mM de ácido m-toluico cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial temprana (DO₆₀₀ = 0,8). a: Tasa de crecimiento específica máxima. PDO: 1,3-propanodiol. Gli: glicerol.

Cuando PhaP se expresó en el contexto genético $\Delta arcA$, los cultivos en lote repetido alcanzaron 24 g.L⁻¹ de PDO, lo que representa un incremento de 220 % en comparación con el control después de 48 hs y de más de 25 %, con respecto a la cepa $\Delta arcA$ que no expresó *phaP* (figura 56A). La biomasa final fue similar para todas las cepas, aunque la mutante $\Delta arcA$ mostró una tasa de crecimiento

reducida en comparación con la cepa de tipo salvaje (Figura 56C). Interesantemente, la disminución de μ_{\max} de la cepa $\Delta arcA$ fue revertida mediante la sobreexpresión de *phaP* (Tabla 15). La cepa control cesó tanto la síntesis de PDO como el consumo de glicerol después de 24 hs, mientras que las mutantes $\Delta arcA$ continuaron usando glicerol para sintetizar PDO durante más de 40 hs. Los cultivos de $\Delta arcA$ +PhaP consumieron glicerol más rápido, lo que también aumentó la velocidad de síntesis de PDO, dando como resultado una productividad más alta ($0,53 \pm 0,02 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) (figura 56B, tabla 15).

Discusión y conclusiones parciales

Durante este trabajo se logró estudiar e identificar el efecto particular de la delección de cada regulador sobre el metabolismo y fisiología de *E. coli*. Para este fin, realizamos varios experimentos y analizamos globalmente los resultados mediante estadística multivariada (Capítulo II). Una de las mutantes que mostró mayor distancia con la cepa control era la cepa mutante $\Delta arcA$. Esto es congruente con el hecho de que este regulador controla una enorme proporción de todos los genes de esta bacteria (Salmon 2005). El efecto más notable que detectamos para estas mutantes de delección fue el aumento en la síntesis de PDO, compuesto de alto valor industrial. Por todo esto, inferimos que el potencial de esta cepa mutante en la producción de este diol podía optimizarse. Para ello, validamos los resultados utilizando cultivos en biorreactor bajo condiciones optimizadas para la síntesis de PDO y, luego de poner a punto el sistema de alimentación de los mismos, se observó un importante aumento en PDO, llegando a casi 24 g.L^{-1} en 48 hs.

Teniendo en cuenta posibles aplicaciones biotecnológicas, optimizamos el medio de cultivo, utilizando uno más definido y económico. Como vimos en el capítulo II, el uso de medio mínimo representa un limitante en esta cepa para la formación de este solvente. Diseñando un medio sintético suplementado con extracto de levadura, pudimos observar nuevamente un aumento en la síntesis del compuesto, de más de 60% con respecto a la cepa salvaje.

Cuando sobreexpresamos *phaP* en cultivos en frascos agitados tanto en medio complejo como en medio semidefinido, observamos un notable aumento de PDO de casi el 100%.

Po último, quisimos confirmar si estos resultados se mantenían en cultivos en fermentador. Al igual que lo observado en cultivos en LB, las mutantes produjeron casi el doble de diol, llegando a 19 g.L^{-1} mientras que la cepa salvaje alcanzó poco más de 11 g.L^{-1} . Cuando sobreexpresamos *phaP* en la $\Delta arcA$, el PDO llegó a más de 24 g.L^{-1} y la cepa mejoró todos los aspectos cinéticos del cultivo, comparado tanto con la cepa salvaje como la mutante que no produce PhaP. Esto representa un

aumento en la síntesis de diol de más de 220%, con respecto a la cepa salvaje y de más de 25 %, con respecto a la cepa mutante sin PhaP.

Dado que se sabe que las mutantes *ΔarcA* proporcionan un entorno intracelular reducido, algunos estudios previos han sugerido el uso potencial de estos mutantes para la síntesis de PDO. Sin embargo, la delección de este regulador global en *Klebsiella pneumoniae* (Lu 2018) o en *E. coli* (Cervin 2008) condujo sólo a leves aumentos (entre 6 y 16,7%) en la síntesis de PDO mientras que en *Citrobacter freundii*, la eliminación de ArcA no afectó el rendimiento de PDO (Marvoet 2016). En todos estos casos, se usaron mutaciones adicionales y modificaciones genéticas durante el desarrollo de cepas sobreproductoras, que podrían enmascarar el efecto de la eliminación de ArcA. Por el contrario, en el presente trabajo se obtuvo un aumento del 73 % en la síntesis de PDO en una mutante *ΔarcA* que no contiene mutaciones adicionales, en cultivos en lote repetido y medio LB.

En vista de los resultados obtenidos, se puede formular la hipótesis de que la ausencia de ArcA hizo que las células continúen utilizando el sustrato, ya que esto se observó tanto con como sin PhaP, mientras que la presencia de PhaP permitió que las células crecieran más rápido y convirtieran más glicerol en PDO, un efecto que se informó previamente en otras cepas de *E. coli* (Mezzina 2017). Los efectos conjuntos de estas dos manipulaciones permitieron un aumento muy importante en la producción de PDO; ya que el efecto positivo en el crecimiento de PhaP potenció aún más el contexto metabólico beneficioso generado por la delección de *arcA*.

Discusión y conclusiones

Conclusiones finales

Impacto de la manipulación de genes regulatorios globales sobre el metabolismo y la respuesta a estrés

Todos los reguladores globales estudiados en este trabajo intervienen en la distribución de carbono intracelular. En todas las mutantes, pudimos observar el aumento de al menos un metabolito. En particular, las mutantes Δrob y Δcra tuvieron los efectos más pronunciados sobre la síntesis de varios ácidos. El fenotipo de la mutante Δcra resultó aún más evidente en cultivos no aireados. En estas mutantes, el aumento de síntesis de metabolitos y la reducción de la biomasa (en comparación al control) podrían explicarse por un aumento del flujo de carbono en la glucólisis y la represión del ciclo de Krebs y la vía de las pentosas fosfato (Saier y Ramseier 1996, Chin 1987, Yao 2013). El aumento en la síntesis de algunos metabolitos ya había sido reportado en cepas de *E. coli* con mutaciones en este regulador global (Ow 2007, Yao 2013) pero aquí, por primera vez, evidenciamos un aumento notable en la síntesis de ácido succínico, compuesto reducido de interés industrial, en mutantes Δcra .

Tolerancia

La ausencia de ArcA, CreC o Rob no afectaría la capacidad de las mutantes de tolerar los factores de estrés asociados por ejemplo a los bioprocesos. No hay grandes diferencias entre la mayoría de las mutantes, teniendo en cuenta los diferentes tipos de estrés y las diferentes condiciones de cultivo. Los aumentos y disminuciones en la tolerancia a solventes, NaCl, antibióticos y el colorante redox azul de toluidina, resultaron ser sutiles para las cepas Δrob , $\Delta creC$ y $\Delta arcA$, con respecto a la cepa parental, aún en diferentes condiciones de aireación. Por su parte, $\Delta arcA$ mostró un aumento en la tolerancia a PDO en cultivos realizados en condiciones de baja disponibilidad de oxígeno, donde la cepa $\Delta arcA$ logró crecer un 50 % más comparado con el control. Esto resulta de interés para la producción de este compuesto en este entorno genético.

Cra estaría involucrado en la respuesta a estrés. La aumentada sensibilidad a estrés de las mutantes Δcra es un inconveniente que podría limitar sus usos para sobreproducir compuestos de relevancia biotecnológica. La mutante Δcra mostró una sensibilidad aumentada a casi todas las condiciones, incluyendo el azul de toluidina, como sucede con mutantes $\Delta arcA$ y su conocido fenotipo Dye (Ruiz

2006). Esto podría indicar que Cra está involucrado en la resistencia a estrés, incluyendo el estrés redox.

BW25113 vs K1060

Existen efectos cepa-dependientes causados por la eliminación de reguladores. Pudimos determinar, a lo largo de este trabajo, la existencia de efectos que son cepa-dependientes. Por ejemplo, mientras que el aumento en el EtOH en $\Delta creC$ fue detectado en la cepa BW25113 utilizada en este trabajo, en la cepa K1060 no hubo diferencias con respecto al control en cultivos con baja aireación. De hecho, la síntesis de este alcohol resultó ser menor en otras condiciones de aireación en la cepa K1060 (Godoy 2014). Además, en la mutante $\Delta creC$ de la cepa K1060 se observó una sensibilidad marcada a azul de toluidina en medio mínimo (Godoy 2014), mientras que, en nuestro caso, no detectamos diferencias de tolerancia en medio rico ni M9, con respecto al control.

Los efectos cepa-específicos más notables fueron los hallados en la cepa $\Delta arcA$. En trabajos anteriores, se pudo demostrar que esta mutante era adecuada para la síntesis de biocompuestos sobre todo en condiciones de baja aerobiosis y a partir de glicerol. En las mutantes $\Delta arcA$ de la cepa elegida para esta tesis, pocas diferencias pudieron verse en condiciones de baja tensión de oxígeno. No pudimos detectar aumentos en la acumulación de PHB ni en la síntesis de PDO en la variante $\Delta arcA$ de BW2511, observando consistentemente que el consumo de glicerol está atenuado en medio mínimo. En particular, esto pone de manifiesto la necesidad e importancia de utilizar cepas con un *pedigree* definido y un genoma completamente secuenciado, con el fin de eliminar otras posibles mutaciones que interfieran con el efecto multifactorial de las mutaciones en genes regulatorios globales.

Producción recombinante de compuestos reducidos

Dado que uno de los objetivos principales de la tesis era evaluar el potencial de las manipulaciones para la producción de compuestos de interés biotecnológico, resumiremos a continuación las características observadas de cada regulador relevantes para síntesis de compuestos reducidos:

Cepa	Ventajas	Desventajas
<i>Δrob</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento en la síntesis de metabolitos fermentativos en baja aireación • Tolerancia similar a la cepa control 	<ul style="list-style-type: none"> • Desaparición del aumento de metabolitos en condiciones sin aireación • Sin efecto sobre la síntesis de los compuestos reducidos estudiados
<i>ΔcreC</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento en la síntesis de etanol, tanto en cepas sin modificaciones como recombinantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Sin efectos sobre otros compuestos reducidos para ninguna de las condiciones estudiadas • Dificultades para el uso del glicerol
<i>Δcra</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento de metabolitos fermentativos tanto en baja como alta aireación • Aumento del 80 % en ácido succínico en cepas optimizadas en cultivos sin aireación en medio mínimo 	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución en la biomasa, sobre todo en condiciones sin aireación y medio mínimo con glicerol como fuente de carbono • Aumento de la sensibilidad a diversos tipos de estrés, principalmente en baja aireación
<i>ΔarcA</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Tolerancia a estrés similar a la cepa control, en términos generales • Aumento de la tolerancia a PDO en condiciones de baja aireación • Aumento en la producción de ácido láctico y etanol, en baja aireación utilizando glucosa • Aumento en la síntesis de PDO de más de 150 % a partir de glicerol • Aumento de más de 100 % en la concentración de PDO en cultivos en biorreactor de cepas optimizadas, a partir de medio de cultivo semidefinido 	<ul style="list-style-type: none"> • Dificultad para metabolizar glicerol en medio mínimo • Aumento de la sensibilidad a estrés oxidativo • Diferencias significativas en la síntesis de PDO solo en condiciones de alta aireación

Tabla 20. Ventajas y desventajas de la manipulación de Rob, Cra, ArcA y CreC, en cuanto a la síntesis de compuestos reducidos en E. coli BW25113.

La eliminación de estos reguladores globales tiene un impacto marcado en la síntesis de compuestos de interés biotecnológico. Todas las cepas mutantes mostraron incrementos para al menos uno de los compuestos estudiados en algunas de las condiciones de aireación utilizadas, esto se pone de manifiesto sobre todo en el metabolismo central del carbono en baja aireación. El fenotipo resultante depende fuertemente de las condiciones de cultivo para la mayoría de las mutantes.

La fuente de carbono influye sobre el efecto de la cada mutación sobre la síntesis de compuestos.

En particular obtuvimos resultados distintos en cuanto al sustrato utilizado para la síntesis de etanol. Más aún, resultó sorprendente la disminución en los niveles de EtOH en las mutantes *ΔcreC* y *ΔarcA* de la colección Keio, con respecto a la cepa control y a lo que habíamos visto en los cultivos en glucosa. Algo similar pudimos observar en la síntesis de PDO, donde el uso del glicerol disminuyó para las mutantes *Δcra*, *ΔcreC* y *ΔarcA*, en particular, bajo condiciones de baja aireación y medio mínimo. Para estas cepas, se ha visto que tienen dificultades para crecer en sustratos como el glicerol en medio mínimo (Chin 1987, Cariss 2008, Nickel 2008), por lo que podría suceder que estas bacterias no puedan redireccionar el flujo de carbono hacia la síntesis de EtOH o PDO, o no haya disponibilidad de poder reductor en estas condiciones.

La cepa *Δcra* es eficiente para la síntesis de succinato en condiciones sin aireación. Como prueba de concepto, utilizamos este contexto genético para favorecer la síntesis de succinato, de acuerdo a lo que vimos en los perfiles metabólicos. Finalmente, tras seleccionar la combinación más eficiente de estrategias y optimizar el medio de cultivo utilizado para estos ensayos, logramos alcanzar casi 3 g.L⁻¹ de ácido succínico, lo cual representa un aumento de casi el 100% con respecto a la cepa control y del 300%, con respecto a la cepa *Δcra* sin modificaciones adicionales. Estudios anteriores indican que Cra regularía de forma directa (afectando su transcripción) (Shimada 2011) e indirecta (a través de la regulación de Crp, regulador global que activa la transcripción los genes *sdhABCD*) (Zhang 2014) el complejo Succinato deshidrogenasa. Este complejo proteico cataliza la conversión de succinato en fumarato, por lo cual, si esas vías metabólicas estuvieran reprimidas, podría acumularse este ácido. Por otro lado, la ausencia de Cra activa la glucólisis, lo que podría provocar un aumento en la disponibilidad de metabolitos precursores necesarios para síntesis de este ácido. La delección de *cra* también reprime el ciclo de Krebs, lo cual podría contribuir a la acumulación de succinato al no ser utilizado para la síntesis de otros ácidos tricarboxílicos. Por último, con la estrategia empleada podrían estar aprovechándose los excesos de precursores como piruvato y, formiato, el cual es sustrato de Fdh para sintetizar CO₂, que puede fijarse en OAA, y poder reductor, necesario en la síntesis de ácido succínico.

La eliminación de *ArcA* provoca un aumento notable en la síntesis de PDO. El efecto más notable que detectamos para las mutantes *ΔarcA* fue el aumento en la síntesis de PDO. Aunque en la primera parte del trabajo no vimos diferencias apreciables en la síntesis de compuestos reducidos, la bibliografía previa demuestra el potencial de este tipo de mutantes en la producción de

bioproductos reducidos (Ruiz 2012). Al igual que hicimos con la síntesis de succinato en la cepa Δcra , procuramos validar nuestra hipótesis sobre la generación de escenarios metabólicos adecuados para producir compuestos industriales, estudiando la síntesis de PDO en cultivos en biorreactor bajo condiciones optimizadas. Luego de poner a punto el sistema de alimentación de los cultivos, se observó un importante aumento en PDO, llegando a casi 24 g.L⁻¹ en 48 hs. Cuando utilizamos un medio semidefinido para estos cultivos, consistentemente observamos un aumento de más de 60 % de PDO, con respecto a la cepa salvaje.

La sobreexpresión *phaP* potencia el efecto del contexto $\Delta arcA$. La estrategia de utilizar PhaP fue muy exitosa, permitiendo un aumento de casi 100 % en la concentración de PDO, en medio rico y definido, en cultivos en frasco agitado. En biorreactor el uso de esta proteína con actividad chaperona causó un aumento de más del 70 % en la síntesis de PDO, comparado con la cepa salvaje y 20 %, con respecto a la mutante sin PhaP. Estos resultados permitieron concluir que PhaP potencia aún más el contexto metabólico beneficioso generado por la ausencia de ArcA para la síntesis de PDO.

Fenotipos particulares entre las distintas mutantes

Existen efectos fenotípicos asociados a cada mutación. Si bien se observaron diferentes niveles de respuesta en los diferentes ensayos realizados, el análisis estadístico utilizado permitió observar fenotipos particulares para cada cepa estudiada. Los análisis multivariados revelaron que la distribución de la mutante Δcra fue la que más se distanció de la cepa salvaje y del resto de las mutantes cuando teníamos en cuenta los perfiles metabólicos. Lo mismo pudo verse para la distribución de grupos en los ensayos de tolerancia, tanto para la mutante Δcra como la $\Delta arcA$. Finalmente, al tener en consideración todas las variables estudiadas en su conjunto, los diferentes análisis que realizamos nos permitieron ver cómo cada cepa tiende a formar grupos discretos casi sin solapamiento, mostrando a las mutantes Δcra y $\Delta arcA$ como los grupos más diferenciados de la cepa control. Esto nos indicaría que el efecto de cada regulador se puede individualizar a pesar de la extensa red de regulación de cada uno, muchas veces con nodos en común (Perrenoud 2005, Shimizu 2013).

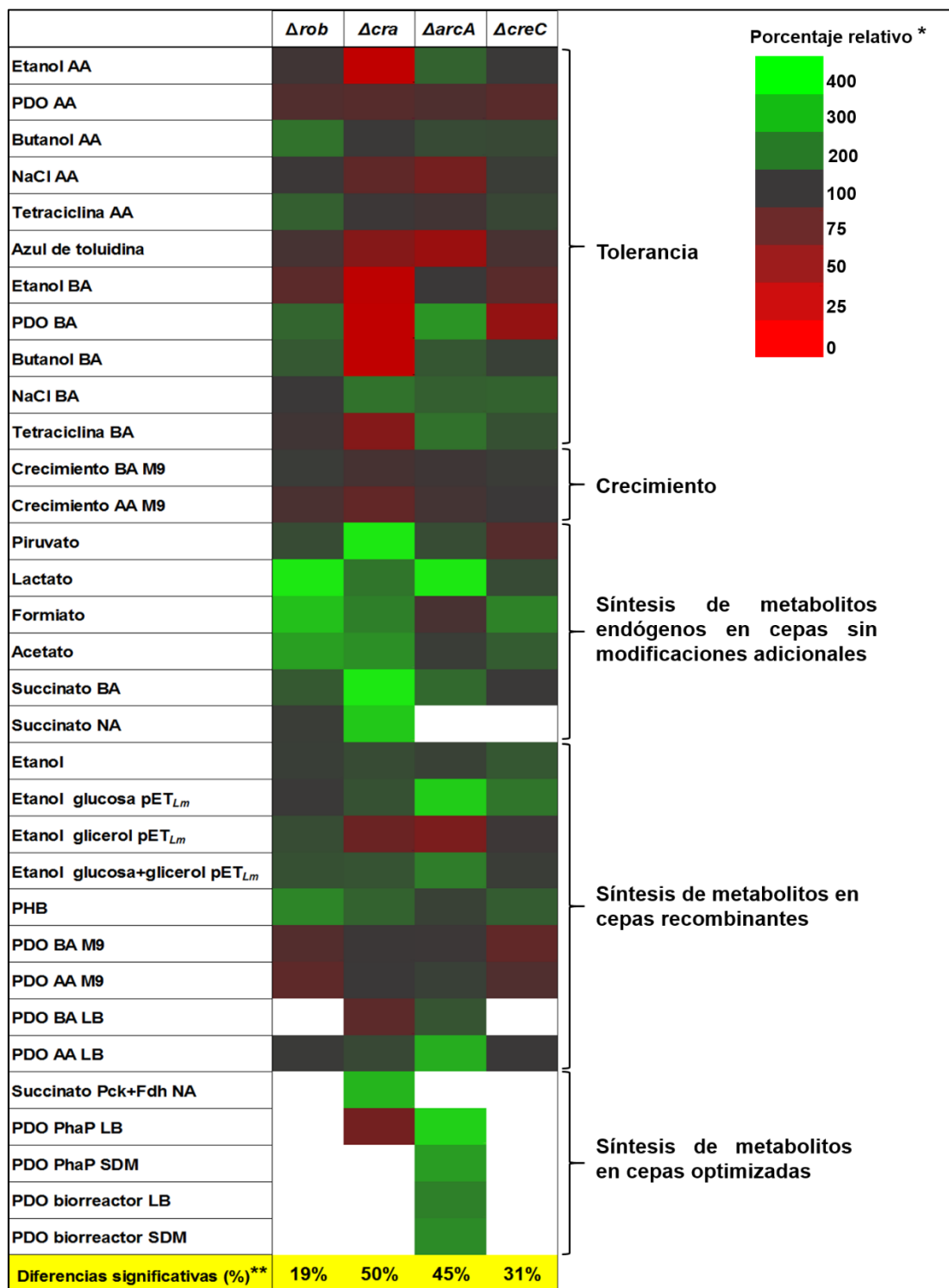


Figura 57. **Evaluación global del desempeño de las mutantes en comparación con la cepa control.** Se relativizó el efecto de la eliminación de cada regulador en cada condición con respecto a la cepa control. Los valores relativos presentados representan el promedio de 3 réplicas independientes. Se tomaron como diferencias significativas aquellas que resultaron ser 40 % mayores o menores, con respecto a lo obtenido en la cepa parental. (*) Representa el porcentaje relativo a la condición control. (**) Representa el porcentaje de resultados con diferencias significativas con respecto al número total de experimentos realizados. AA: alta aireación, BA: baja aireación, NA: no aireado, PDO: 1,3-propanodiol, PHB: Polihidroxibutirato, SDM: medio sintético para la síntesis de PDO, pET_{Lm}: cepas recombinantes expresando la AdhE de *L. mesenteroides* para la síntesis de etanol. Pck+Fdh: cepa Δcra expresando enzimas anapleróticas para optimizar la síntesis de succinato.

Las mutantes Δcra y $\Delta arcA$ pueden considerarse adecuadas para la síntesis de bioproductos de alto valor industrial. Para mostrar de manera resumida las características más relevantes de cada mutante, para posibles aplicaciones en procesos de producción de diferentes compuestos se graficaron las diferencias relativas a la cepa salvaje tomando en cuenta múltiples variables (Figura 57). Se ve claramente en esta figura como la eliminación de Cra y ArcA altera profundamente el fenotipo de *E. coli* BW25113, dado que estas cepas muestran cambios significativos en aproximadamente el 50 % de las condiciones estudiadas.

Teniendo en cuenta los escenarios genéticos y metabólicos creados por la delección de los reguladores globales, y evidenciados a través de:

- i) ensayos de caracterización metabólica
- ii) síntesis heteróloga de compuestos
- iii) análisis estadístico multivariado y
- iv) optimización por ingeniería metabólica de vías para la síntesis de succinato y PDO,

podemos afirmar que la eliminación de Cra, el principal regulador del metabolismo central del carbono (Kochanowski 2013) o de ArcA, que controla directa o indirectamente una parte importantísima (del 5 al 10 %) de todos los genes en *E. coli* (Salmon 2005), podrían ser estrategias adecuadas para el desarrollo de cepas sobreproductoras de succinato y PDO respectivamente.

Perspectivas

A pesar de que se eligieron para este trabajo solamente algunos compuestos representativos, la descripción de los contextos metabólicos generados por la ausencia de cada uno de los reguladores globales abre la posibilidad de analizar el uso de estas cepas para la síntesis de otros compuestos de interés biotecnológico.

Bibliografía

Bibliografía

- Abbad-Andaloussi, S., Amine, J., Gerard, P., & Petitdemange, H. (1998). Effect of glucose on glycerol metabolism by *Clostridium butyricum* DSM 5431. *Journal of applied microbiology*, 84(4), 515-522.
- Abbott, D. A., Zelle, R. M., Pronk, J. T., & Van Maris, A. J. (2009). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of carboxylic acids: current status and challenges. *FEMS yeast research*, 9(8), 1123-1136.
- Alexeeva, S., de Kort, B., Sawers, G., Hellingwerf, K. J., & de Mattos, M. J. T. (2000). Effects of limited aeration and of the ArcAB system on intermediary pyruvate catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 182(17), 4934-4940.
- Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J., & de Mattos, M. J. T. (2003). Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions. *Journal of bacteriology*, 185(1), 204-209.
- Alsaker, K. V., Paredes, C., & Papoutsakis, E. T. (2010). Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: gene-expression-based systems analysis of butanol, butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnology and bioengineering*, 105(6), 1131-1147.
- Ariza, R. R., Li, Z., Ringstad, N., & Demple, B. (1995). Activation of multiple antibiotic resistance and binding of stress-inducible promoters by *Escherichia coli* Rob protein. *Journal of bacteriology*, 177(7), 1655-1661.
- Asako, H., Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M., & Aono, R. (1997). Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of *marA* in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 63(4), 1428-1433.
- Åslund, F., Zheng, M., Beckwith, J., & Storz, G. (1999). Regulation of the OxyR transcription factor by hydrogen peroxide and the cellular thiol—disulfide status. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(11), 6161-6165.
- Atsumi, S., Wu, T. Y., Machado, I. M., Huang, W. C., Chen, P. Y., Pellegrini, M., & Liao, J. C. (2010). Evolution, genomic analysis, and reconstruction of isobutanol tolerance in *Escherichia coli*. *Molecular systems biology*, 6(1), 449.
- Avison, M. B., Horton, R. E., Walsh, T. R., & Bennett, P. M. (2001). *Escherichia coli* CreBC is a global regulator of gene expression that responds to growth in minimal media. *Journal of Biological*
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., ... & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2(1).
- Baba, T., Huan, H. C., Datsenko, K., Wanner, B. L., & Mori, H. (2008). The applications of systematic in-frame, single-gene knockout mutant collection of *Escherichia coli* K-12. In *Microbial Gene Essentiality: Protocols and Bioinformatics* (pp. 183-194). Humana Press.
- Balzer, G. J., Thakker, C., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2013). Metabolic engineering of *Escherichia coli* to minimize byproduct formate and improving succinate productivity through increasing NADH

availability by heterologous expression of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic engineering*, 20, 1-8.

- Barbosa, T. M., & Levy, S. B. (2000). Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *Journal of bacteriology*, 182(12), 3467-3474.
- Barriere, C., Veiga-da-Cunha, M., Pons, N., Guédon, E., van Hijum, S. A., Kok, J., ... & Renault, P. (2005). Fructose utilization in *Lactococcus lactis* as a model for low-GC gram-positive bacteria: its regulator, signal, and DNA-binding site. *Journal of bacteriology*, 187(11), 3752-3761.
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011). The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology*, 65, 189-213.
- Bennik, M. H., Pomposiello, P. J., Thorne, D. F., & Demple, B. (2000). Defining a *rob* Regulon in *Escherichia coli* by Using Transposon Mutagenesis. *Journal of bacteriology*, 182(13), 3794-3801.
- Berríos-Rivera, S. J., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2002). The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metabolic engineering*, 4(3), 230-237.
- Bettenbrock, K., Bai, H., Ederer, M., Green, J., Hellingwerf, K. J., Holcombe, M., ... & Sharma, P. (2014). Towards a systems level understanding of the oxygen response of *Escherichia coli*. In *Advances in microbial physiology* (Vol. 64, pp. 65-114). Academic Press.
- Bettenbrock, K., Fischer, S., Kremling, A., Jahreis, K., Sauter, T., & Gilles, E. D. (2006). A quantitative approach to catabolite repression in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(5), 2578-2584.
- Bley Folly, B., Ortega, A. D., Hubmann, G., Bonsing-Vedelaar, S., Wijma, H. J., van der Meulen, P., & Heinemann, M. (2018). Assessment of the interaction between the flux-signaling metabolite fructose-1, 6-bisphosphate and the bacterial transcription factors CggR and Cra. *Molecular Microbiology*.
- Boch, J., Kempf, B., Schmid, R., & Bremer, E. (1996). Synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in *Bacillus subtilis*: characterization of the *gbsAB* genes. *Journal of bacteriology*, 178(17), 5121-5129.
- Brückner, R., & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS microbiology letters*, 209(2), 141-148.
- Buxton, R. S., & Drury, L. S. (1983). Cloning and insertional inactivation of the *dye* (*sfrA*) gene, mutation of which affects sex factor F expression and dye sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 154(3), 1309-1314.
- Cabiscol Català, E., Tamarit Sumalla, J., & Ros Salvador, J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *International Microbiology*, 2000, vol. 3, núm. 1, p. 3-8.
- Calamita, G., Bishai, W. R., Preston, G. M., Guggino, W. B., & Agre, P. (1995). Molecular cloning and characterization of AqpZ, a water channel from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(49), 29063-29066.
- Cariss, S. J. L., Constantinidou, C., Patel, M. D., Takebayashi, Y., Hobman, J. L., Penn, C. W., & Avison, M. B. (2010). YieJ (CbrC) mediates CreBC-dependent colicin E2 tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 192(13), 3329-3336.

- Cariss, S. J. L., Tayler, A. E., & Avison, M. B. (2008). Defining the growth conditions and promoter-proximal DNA sequences required for activation of gene expression by CreBC in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(11), 3930-3939
- Cervin, M. A., Soucaille, P., & Valle, F. (2008). U.S. Patent No. 7,371,558. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Chavarría, M., Durante-Rodríguez, G., Krell, T., Santiago, C., Brezovsky, J., Damborsky, J., & de Lorenzo, V. (2014). Fructose 1-phosphate is the one and only physiological effector of the Cra (FruR) regulator of *Pseudomonas putida*. *FEBS open bio*, 4, 377-386.
- Chavarría, M., Santiago, C., Platero, R., Krell, T., Casasnovas, J. M., & de Lorenzo, V. (2011). Fructose 1-phosphate is the preferred effector of the metabolic regulator Cra of *Pseudomonas putida*. *Journal of Biological Chemistry*, jbc-M110.
- Chen, H., Fang, B., & Hu, Z. (2007). Simultaneous HPLC determination of four key metabolites in the metabolic pathway for production of 1, 3-propanediol from glycerol. *Chromatographia*, 65(9-10), 629-632.
- Chen, X., Jiang, S., Li, X., Pan, L., Zheng, Z., & Luo, S. (2013). Production of succinic acid and lactic acid by *Corynebacterium crenatum* under anaerobic conditions. *Annals of microbiology*, 63(1), 39-44.
- Chen, Z., Geng, F., & Zeng, A. P. (2015). Protein design and engineering of a de novo pathway for microbial production of 1, 3-propanediol from glucose. *Biotechnology journal*, 10(2), 284-289.
- Chen, Z., Liu, H., & Liu, D. (2011). Metabolic pathway analysis of 1, 3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase. *Biochemical engineering journal*, 54(3), 151-157.
- Cheng, K. K., Liu, D. H., Sun, Y., & Liu, W. B. (2004). 1, 3-Propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* under different aeration strategies. *Biotechnology letters*, 26(11), 911-915.
- Cheng, K. K., Zhao, X. B., Zeng, J., & Zhang, J. A. (2012). Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 302-318.
- Cherubini, F. (2010). The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy conversion and management*, 51(7), 1412-1421.
- Chin, A. M., Feldheim, D. A., & Saier, M. H. (1989). Altered transcriptional patterns affecting several metabolic pathways in strains of *Salmonella typhimurium* which overexpress the fructose regulon. *Journal of bacteriology*, 171(5), 2424-2434.
- Chin, A. M., Feucht, B. U., & Saier, M. H. (1987). Evidence for regulation of gluconeogenesis by the fructose phosphotransferase system in *Salmonella typhimurium*. *Journal of bacteriology*, 169(2), 897-899.
- Chubukov V, Gerosa L, Kochanowski K, Sauer U (2014). Coordination of microbial metabolism. *Nat Rev Microbiol* 12: 327 – 340
- Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R., & Stanier, R. Y. (1957). Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 49(1), 25-68.
- Colin, T., Bories, A., & Moulin, G. (2000). Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1, 3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54(2), 201-205.

- Costenoble R, Picotti P, Reiter L, Stallmach R, Heinemann M, Sauer U, Aebbersold R (2011). Comprehensive quantitative analysis of central carbon and amino-acid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* under multiple conditions by targeted proteomics. *Mol Syst Biol* 7: 464
- da Silva, G. P., de Lima, C. J. B., & Contiero, J. (2015). Production and productivity of 1, 3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* GLC29. *Catalysis Today*, 257, 259-266.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.
- de Almeida, A., Catone, M. V., Rhodius, V. A., Gross, C. A., & Pettinari, M. J. (2011). Unexpected stress-reducing effect of PhaP, a poly (3-hydroxybutyrate) granule-associated protein, in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6622-6629.
- Demain, A. L. (2009). Biosolutions to the energy problem. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 36(3), 319-332.
- Demple, B. (1996). Redox signaling and gene control in the *Escherichia coli* *soxRS* oxidative stress regulon—a review. *Gene*, 179(1), 53-57.
- Deng, Z., Shan, Y., Pan, Q., Gao, X., & Yan, A. (2013). Anaerobic expression of the *gadE-mdtEF* multidrug efflux operon is primarily regulated by the two-component system ArcBA through antagonizing the H-NS mediated repression. *Frontiers in microbiology*, 4, 194.
- Desmond, C., Fitzgerald, G. F., Stanton, C., & Ross, R. P. (2004). Improved stress tolerance of GroESL-overproducing *Lactococcus lactis* and probiotic *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5929-5936.
- Dessein, A., Schwartz, M., & Ullmann, A. (1978). Catabolite repression in *Escherichia coli* mutants lacking cyclic AMP. *Molecular and General Genetics MGG*, 162(1), 83-87.
- Dong, H., Nilsson, L., & Kurland, C. G. (1995). Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of bacteriology*, 177(6), 1497-1504.
- Dong, X. Y., Xiu, Z. L., Li, S., Hou, Y. M., Zhang, D. J., & Ren, C. S. (2010). Dielectric barrier discharge plasma as a novel approach for improving 1, 3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnology letters*, 32(9), 1245-1250.
- Dover, N., Higgins, C. F., Carmel, O., Rimon, A., Pinner, E., & Padan, E. (1996). Na⁺-induced transcription of *nhaA*, which encodes an Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*, is positively regulated by *nhaR* and affected by *hns*. *Journal of bacteriology*, 178(22), 6508-6517.
- Du, C., Zhang, Y., Li, Y., & Cao, Z. A. (2007). Novel redox potential-based screening strategy for rapid isolation of *Klebsiella pneumoniae* mutants with enhanced 1, 3-propanediol-producing capability. *Applied and environmental microbiology*, 73(14), 4515-4521.
- Dunlop, M. J. (2011). Engineering microbes for tolerance to next-generation biofuels. *Biotechnology for biofuels*, 4(1), 32.
- Durgapal, M., Kumar, V., Yang, T. H., Lee, H. J., Seung, D., & Park, S. (2014). Production of 1, 3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. *Bioresource technology*, 159, 223-231.

- Durnin, G., Clomburg, J., Yeates, Z., Alvarez, P. J., Zygorakis, K., Campbell, P., & Gonzalez, R. (2009). Understanding and harnessing the microaerobic metabolism of glycerol in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 103(1), 148-161.
- Elbein, A. D., Pan, Y. T., Pastuszak, I., & Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17R-27R.
- Fisher, M. A., Boyarskiy, S., Yamada, M. R., Kong, N., Bauer, S., & Tullman-Ercek, D. (2013). Enhancing tolerance to short-chain alcohols by engineering the *Escherichia coli* AcrB efflux pump to secrete the non-native substrate n-butanol. *ACS synthetic biology*, 3(1), 30-40.
- Flamholz, A., Noor, E., Bar-Even, A., Liebermeister, W., & Milo, R. (2013). Glycolytic strategy as a tradeoff between energy yield and protein cost. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201215283.
- Flora AB. (2015). Detecção e clonagem de genes de biossíntese de 1,3-propanodiol a partir de glicerol em 589 *Klebsiella pneumoniae* GLC29. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP - IPT - I.590 Butantan.
- Frey, P. A. (1996). The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *The FASEB Journal*, 10(4), 461-470.
- Garg, U., Frazee Iii, C. C., Kiscoan, M., Scott, D., Peterson, B., & Cathcart, D. (2008). A fatality involving 1, 3-propanediol and its implications in measurement of other glycols. *Journal of analytical toxicology*, 32(4), 324-326.
- George, K. W., Chen, A., Jain, A., Batth, T. S., Baidoo, E. E., Wang, G., ... & Lee, T. S. (2014). Correlation analysis of targeted proteins and metabolites to assess and engineer microbial isopentenol production. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8), 1648-1658.
- Georgellis, D., Kwon, O., & Lin, E. C. (2001). Quinones as the redox signal for the arc two-component system of bacteria. *Science*, 292(5525), 2314-2316.
- Georgellis, D., Lynch, A. S., & Lin, E. C. (1997). In vitro phosphorylation study of the *arc* two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(17), 5429-5435.
- Gerosa L, Kochanowski K, Heinemann M, Sauer U (2013). Dissecting specific and global transcriptional regulation of bacterial gene expression. *Mol Syst Biol* 9: 658
- Godoy, M. S. (2014). Efectos del sistema regulador CreBC sobre el flujo de carbono en *Escherichia coli* y su manipulación para incrementar la síntesis de compuestos de interés industrial. Carrera de doctorado de la Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.
- Godoy, M. S., Nikel, P. I., Gomez, J. G. C., & Pettinari, M. J. (2016). The CreC regulator of *Escherichia coli*, a new target for metabolic manipulations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(1), 244-254.
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613.
- Gottesman, S. (1984). Bacterial regulation: global regulatory networks. *Annual review of genetics*, 18(1), 415-441.

- Goulas, K. A., & Toste, F. D. (2016). Combining microbial production with chemical upgrading. *Current opinion in biotechnology*, 38, 47-53.
- Green, J., & Paget, M. S. (2004). Bacterial redox sensors. *Nature Reviews Microbiology*, 2(12), 954.
- Grenier, F., Matteau, D., Baby, V., & Rodrigue, S. (2014). Complete genome sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announc* 2 (5): e01038-14.
- Harmsen, P. F., Hackmann, M. M., & Bos, H. L. (2014). Green building blocks for bio-based plastics. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 8(3), 306-324.
- He, A., Kong, X., Wang, C., Wu, H., Jiang, M., Ma, J., & Ouyang, P. (2016). Efficient carbon dioxide utilization and simultaneous hydrogen enrichment from off-gas of acetone–butanol–ethanol fermentation by succinic acid producing *Escherichia coli*. *Bioresource technology*, 214, 861-865.
- HENGGE-ARONIS, R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*. *Bacterial stress responses*.
- Hoffmann, F., & Rinas, U. (2000). Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*, 16(6), 1000-1007.
- Horng, Y. T., Chang, K. C., Chou, T. C., Yu, C. J., Chien, C. C., Wei, Y. H., & Soo, P. C. (2010). Inactivation of *dhaD* and *dhaK* abolishes by-product accumulation during 1, 3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 37(7), 707-716.
- Iuchi, S., & Lin, E. (1988). *arcA* (dye), a global regulatory gene in *Escherichia coli* mediating repression of enzymes in aerobic pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(6), 1888-1892.
- Jair, K. W., Yu, X., Skarstad, K., Thöny, B., Fujita, N., Ishihama, A., & Wolf, R. E. (1996). Transcriptional activation of promoters of the superoxide and multiple antibiotic resistance regulons by Rob, a binding protein of the *Escherichia coli* origin of chromosomal replication. *Journal of bacteriology*, 178(9), 2507-2513.
- Jakob, K., Satorhelyi, P., Lange, C., Wendisch, V. F., Silakowski, B., Scherer, S., & Neuhaus, K. (2007). Gene expression analysis of *Corynebacterium glutamicum* subjected to long-term lactic acid adaptation. *Journal of bacteriology*, 189(15), 5582-5590.
- Jang, Y. S., Kim, B., Shin, J. H., Choi, Y. J., Choi, S., Song, C. W., ... & Lee, S. Y. (2012). Bio-based production of C2–C6 platform chemicals. *Biotechnology and bioengineering*, 109(10), 2437-2459.
- Jantama, K., Haupt, M. J., Svoronos, S. A., Zhang, X., Moore, J. C., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2008). Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate. *Biotechnology and bioengineering*, 99(5), 1140-1153.
- Jiang, M., Ma, J., Wu, M., Liu, R., Liang, L., Xin, F., ... & Dong, W. (2017). Progress of succinic acid production from renewable resources: metabolic and fermentative strategies. *Bioresource technology*.
- Jin, P., Lu, S. G., Huang, H., Luo, F., & Li, S. (2011). Enhanced reducing equivalent generation for 1, 3-propanediol production through cofermentation of glycerol and xylose by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 165(7-8), 1532-1542.

- Jun, S. A., Moon, C., Kang, C. H., Kong, S. W., Sang, B. I., & Um, Y. (2010). Microbial fed-batch production of 1, 3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 161(1-8), 491-501.
- Jürgen, B., Lin, H. Y., Riemschneider, S., Scharf, C., Neubauer, P., Schmid, R., ... & Schweder, T. (2000). Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 70(2), 217-224.
- Kang, Z., Wang, X., Li, Y., Wang, Q., & Qi, Q. (2012). Small RNA RyhB as a potential tool used for metabolic engineering in *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, 34(3), 527-531.
- Kaur, G., Srivastava, A. K., & Chand, S. (2015). Debottlenecking product inhibition in 1, 3-propanediol fermentation by In-Situ Product Recovery. *Bioresource technology*, 197, 451-457.
- Keren, L., Zackay, O., Lotan-Pompan, M., Barenholz, U., Dekel, E., Sasson, V., & Alon, U. (2013). Promoters maintain their relative activity levels under different growth conditions. *Molecular systems biology*, 9(1), 701.
- Kim, D., Seo, S. W., Gao, Y., Nam, H., Guzman, G. I., Cho, B. K., & Palsson, B. O. (2018). Systems assessment of transcriptional regulation on central carbon metabolism by Cra and CRP. *Nucleic acids research*, 46(6), 2901-2917.
- Kim, S. M., Choi, B. Y., Ryu, Y. S., Jung, S. H., Park, J. M., Kim, G. H., & Lee, S. K. (2015). Simultaneous utilization of glucose and xylose via novel mechanisms in engineered *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 30, 141-148.
- Kivisaar, M. (2003). Stationary phase mutagenesis: mechanisms that accelerate adaptation of microbial populations under environmental stress. *Environmental microbiology*, 5(10), 814-827.
- Klumpp S, Zhang Z, Hwa T (2009). Growth rate-dependent global effects on gene expression in bacteria. *Cell* 139: 1366 – 1375
- Kochanowski, K., Gerosa, L., Brunner, S. F., Christodoulou, D., Nikolaev, Y. V., & Sauer, U. (2017). Few regulatory metabolites coordinate expression of central metabolic genes in *Escherichia coli*. *Molecular systems biology*, 13(1), 903.
- Kraus, G. A. (2008). Synthetic methods for the preparation of 1, 3-propanediol. *CLEAN–Soil, Air, Water*, 36(8), 648-651.
- Kuhn, E. R. (2002). Water injections in GC-How wet can you get?. *LC GC NORTH AMERICA*, 20(5), 474-478.
- Lange, R., & Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 5(1), 49-59.
- Lee, P. C., Lee, S. Y., Hong, S. H., & Chang, H. N. (2003). Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor. *Bioprocess and biosystems engineering*, 26(1), 63-67.
- Lee, S. J., Song, H., & Lee, S. Y. (2006). Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1939-1948.

- Li, N., Zhang, B., Chen, T., Wang, Z., Tang, Y. J., & Zhao, X. (2013). Directed pathway evolution of the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* for improved aerobic succinate production from glycerol. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 40(12), 1461-1475.
- Li, Z., Nimtz, M., & Rinas, U. (2014). The metabolic potential of *Escherichia coli* BL21 in defined and rich medium. *Microbial cell factories*, 13(1), 45.
- Lin, H., Bennett, G. N., & San, K. Y. (2005). Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions. *Biotechnology and bioengineering*, 90(6), 775-779.
- Litsios, A., Ortega, A. D., Wit, E. C., & Heinemann, M. (2018). Metabolic-flux dependent regulation of microbial physiology. *Current opinion in microbiology*, 42, 71-78.
- Liu, L., Duan, X., & Wu, J. (2016). Modulating the direction of carbon flow in *Escherichia coli* to improve l-tryptophan production by inactivating the global regulator FruR. *Journal of biotechnology*, 231, 141-148.
- Liu, R., Liang, L., Chen, K., Ma, J., Jiang, M., Wei, P., & Ouyang, P. (2012). Fermentation of xylose to succinate by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*, 94(4), 959-968.
- Loo, C. Y., Mittrakul, K., Voss, I. B., Hughes, C. V., & Ganeshkumar, N. (2003). Involvement of an inducible fructose phosphotransferase operon in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *Journal of bacteriology*, 185(21), 6241-6254.
- Lu, S., Xiong, J., Zhu, Y., Guo, F., & Meng, Q. (2011). Screening of 1, 3-propanediol high yield strain by UV mutagenesis of protoplast. *Chinese J Bioprocess Eng*, 19(3), 11-6.
- Lu, X. Y., Ren, S. L., Lu, J. Z., Zong, H., Song, J., & Zhuge, B. (2018). Enhanced 1, 3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae* by a combined strategy of strengthening the TCA cycle and weakening the glucose effect. *Journal of applied microbiology*, 124(3), 682-690.
- Lynch, A. S. (1996). Responses in molecular oxygen. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, 1526-1538.
- Lynch, A. S., & Lin, E. C. (1996). Transcriptional control mediated by the ArcA two-component response regulator protein of *Escherichia coli*: characterization of DNA binding at target promoters. *Journal of Bacteriology*, 178(21), 6238-6249.
- Ma, J., Li, F., Liu, R., Liang, L., Ji, Y., Wei, C., ... & Ouyang, P. (2014). Succinic acid production from sucrose and molasses by metabolically engineered *E. coli* using a cell surface display system. *Biochemical engineering journal*, 91, 240-249.
- Maervoet, V. E., De Maeseneire, S. L., Avci, F. G., Beauprez, J., Soetaert, W. K., & De Mey, M. (2014). 1, 3-propanediol production with *Citrobacter werkmanii* DSM17579: effect of a *dhaD* knock-out. *Microbial cell factories*, 13(1), 70.
- Maervoet, V. E., De Mey, M., Beauprez, J., De Maeseneire, S., & Soetaert, W. K. (2010). Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1, 3-propanediol using metabolic engineering. *Organic Process Research & Development*, 15(1), 189-202.
- Magasanik, B. (1961). Catabolite repression. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 26, pp. 249-256). Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Mahan, M. J., Slauch, J. M., & Mekalanos, J. J. (1996). Environmental regulation of virulence gene expression in *Escherichia*, *Salmonella*, and *Shigella* spp. *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2, 2803-2815.
- Malpica, R., Franco, B., Rodríguez, C., Kwon, O., & Georgellis, D. (2004). Identification of a quinone-sensitive redox switch in the ArcB sensor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(36), 13318-13323.
- Malpica, R., Sandoval, G. R. P., Rodríguez, C., Franco, B., & Georgellis, D. (2006). Signaling by the *arc* two-component system provides a link between the redox state of the quinone pool and gene expression. *Antioxidants & redox signaling*, 8(5-6), 781-795.
- Mandin, P., & Gottesman, S. (2010). Integrating anaerobic/aerobic sensing and the general stress response through the ArcZ small RNA. *The EMBO journal*, 29(18), 3094-3107.
- Martin, R. G., & Rosner, J. L. (1997). Fis, an accessory factor for transcriptional activation of the *mar* (multiple antibiotic resistance) promoter of *Escherichia coli* in the presence of the activator MarA, SoxS, or Rob. *Journal of bacteriology*, 179(23), 7410-7419.
- Martin, R. G., & Rosner, J. L. (2002). Genomics of the *marA/soxS/rob* regulon of *Escherichia coli*: identification of directly activated promoters by application of molecular genetics and informatics to microarray data. *Molecular microbiology*, 44(6), 1611-1624.
- Martin, R. G., Gillette, W. K., Rhee, S., & Rosner, J. L. (1999). Structural requirements for *mar* box function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Molecular microbiology*, 34(3), 431-441.
- Martinez, A., Grabar, T. B., Shanmugam, K. T., Yomano, L. P., York, S. W., & Ingram, L. O. (2007). Low salt medium for lactate and ethanol production by recombinant *Escherichia coli* B. *Biotechnology letters*, 29(3), 397-404.
- Martinez-Antonio, A., & Collado-Vides, J. (2003). Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 6(5), 482-489.
- Mazière, A., Prinsen, P., García, A., Luque, R., & Len, C. (2017). A review of progress in (bio) catalytic routes from/to renewable succinic acid. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 11(5), 908-931.
- McKinlay, J. B., Vieille, C., & Zeikus, J. G. (2007). Prospects for a bio-based succinate industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 76(4), 727-740.
- Meng, J., Wang, B., Liu, D., Chen, T., Wang, Z., & Zhao, X. (2016). High-yield anaerobic succinate production by strategically regulating multiple metabolic pathways based on stoichiometric maximum in *Escherichia coli*. *Microbial cell factories*, 15(1), 141.
- Meynial-Salles, I., Dorotyn, S., & Soucaille, P. (2008). A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield, titer, and productivity. *Biotechnology and bioengineering*, 99(1), 129-135.
- Mezzina, M. P. (2014). Análisis Funcional y Estructural de la Phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA-8 y su Rol en *Escherichia coli* Recombinante. Carrera de doctorado de la Universidad de Buenos Aires. Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Ciudad de Buenos Aires, Argentina.

- Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Appl. Environ. Microbiol.*, 82(17), 5060-5067.
- Mezzina, M. P., Álvarez, D., Egoburo, D., Peña, R. D., Nikel, P. I., & Pettinari, M. J. (2017). A new player in the biorefineries field: phasin PhaP enhances tolerance to solvents and boosts ethanol and 1, 3-propanediol synthesis in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, AEM-00662.
- Mezzina, M. P., Wetzler, D. E., de Almeida, A., Dinjaski, N., Prieto, M. A., & Pettinari, M. J. (2015). A phasin with extra talents: a polyhydroxyalkanoate granule-associated protein has chaperone activity. *Environmental microbiology*, 17(5), 1765-1776.
- Millard, C. S., Chao, Y. P., Liao, J. C., & Donnelly, M. I. (1996). Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), 1808-1810.
- Mingardon, F., Clement, C., Hirano, K., Nhan, M., Luning, E. G., Chanal, A., & Mukhopadhyay, A. (2015). Improving olefin tolerance and production in *E. coli* using native and evolved AcrB. *Biotechnology and bioengineering*, 112(5), 879-888.
- Monod, J. (1942). Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes.
- Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M., Asako, H., & Aono, R. (1995). Overexpression of the *robA* gene increases organic solvent tolerance and multiple antibiotic and heavy metal ion resistance in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 61(6), 2302-2307.
- Nakamura, C. E., & Whited, G. M. (2003). Metabolic engineering for the microbial production of 1, 3-propanediol. *Current opinion in biotechnology*, 14(5), 454-459.
- Nègre, D., Bonod-Bidaud, C., Geourjon, C., Deléage, G., Cozzzone, A. J., & Cortay, J. C. (1996). Definition of a consensus DNA-binding site for the *Escherichia coli* pleiotropic regulatory protein, FruR. *Molecular microbiology*, 21(2), 257-266.
- Nègre, D., Oudot, C., Prost, J. F., Murakami, K., Ishihama, A., Cozzzone, A. J., & Cortay, J. C. (1998). FruR-mediated transcriptional activation at the *ppsA* promoter of *Escherichia coli*1. *Journal of molecular biology*, 276(2), 355-365.
- Nicolaou, S. A., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2010). A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: from biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation. *Metabolic engineering*, 12(4), 307-331.
- Nicolas, C., Kiefer, P., Letisse, F., Krömer, J., Massou, S., Soucaille, P., ... & Portais, J. C. (2007). Response of the central metabolism of *Escherichia coli* to modified expression of the gene encoding the glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS letters*, 581(20), 3771-3776.
- Nikel, P. I., Ramirez, M. C., Pettinari, M. J., Méndez, B. S., & Galvagno, M. A. (2010). Ethanol synthesis from glycerol by *Escherichia coli* redox mutants expressing *adhE* from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of applied microbiology*, 109(2), 492-504.
- Nikel, P. I., Zhu, J., San, K. Y., Méndez, B. S., & Bennett, G. N. (2009). Metabolic flux analysis of *Escherichia coli creB* and *arcA* mutants reveals shared control of carbon catabolism under microaerobic growth conditions. *Journal of bacteriology*, 191(17), 5538-5548.

- Nizam, S. A., & Shimizu, K. (2008). Effects of *arcA* and *arcB* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli* under anaerobic and microaerobic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 42(3), 229-236.
- Nizam, S. A., Zhu, J., Ho, P. Y., & Shimizu, K. (2009). Effects of *arcA* and *arcB* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli* under aerobic condition. *Biochemical Engineering Journal*, 44(2-3), 240-250.
- Njoroge, J. W., Nguyen, Y., Curtis, M. M., Moreira, C. G., & Sperandio, V. (2012). Virulence meets metabolism: Cra and KdpE gene regulation in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *MBio*, 3(5), e00280-12.
- Oh, B. R., Hong, W. K., Heo, S. Y., Luo, L. H., Kondo, A., Seo, J. W., & Kim, C. H. (2013). The production of 1, 3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. *Bioresource technology*, 130, 719-724.
- Oh, B. R., Seo, J. W., Heo, S. Y., Luo, L. H., Hong, W. K., Park, D. H., & Kim, C. H. (2013). Efficient production of 1, 3-propanediol from glycerol upon constitutive expression of the 1, 3-propanediol oxidoreductase gene in engineered *Klebsiella pneumoniae* with elimination of by-product formation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 36(6), 757-763.
- Okochi, M., Kurimoto, M., Shimizu, K., & Honda, H. (2008). Effect of global transcriptional regulators related to carbohydrate metabolism on organic solvent tolerance in *Escherichia coli*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 105(4), 389-394.
- Orton, D. J., Boyd, J. M., Affleck, D., Duce, D., Walsh, W., & Seiden-Long, I. (2016). One-step extraction and quantitation of toxic alcohols and ethylene glycol in plasma by capillary gas chromatography (GC) with flame ionization detection (FID). *Clinical biochemistry*, 49(1-2), 132-138.
- Ow, D. S. W., Lee, R. M. Y., Nissom, P. M., Philp, R., Oh, S. K. W., & Yap, M. G. S. (2007). Inactivating FruR global regulator in plasmid-bearing *Escherichia coli* alters metabolic gene expression and improves growth rate. *Journal of biotechnology*, 131(3), 261-269.
- Paredes, C. J., Alsaker, K. V., & Papoutsakis, E. T. (2005). A comparative genomic view of clostridial sporulation and physiology. *Nature Reviews Microbiology*, 3(12), 969.
- Parkinson, J. S., & Kofoed, E. C. (1992). Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annual review of genetics*, 26(1), 71-112.
- Patten, C. L., Kirchhof, M. G., Schertzberg, M. R., Morton, R. A., & Schellhorn, H. E. (2004). Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular Genetics and Genomics*, 272(5), 580-591.
- Perrenoud, A., & Sauer, U. (2005). Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 187(9), 3171-3179.
- Pettinari, M. J., Nikel, P. I., Ruiz, J. A., & Méndez, B. S. (2008). ArcA redox mutants as a source of reduced bioproducts. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 15(1), 41-47.
- Pollack, J. R., & Iyer, V. R. (2002). Characterizing the physical genome. *Nature genetics*, 32, 515..

- Pomposiello, P. J., Bennik, M. H., & Demple, B. (2001). Genome-Wide Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate. *Journal of bacteriology*, 183(13), 3890-3902.
- Portnoy, V. A., Bezdan, D., & Zengler, K. (2011). Adaptive laboratory evolution—harnessing the power of biology for metabolic engineering. *Current opinion in biotechnology*, 22(4), 590-594.
- Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews*, 57(3), 543-594.
- Ramseier, T. M., Nègre, D., Cortay, J. C., Scarabel, M., Cozzone, A. J., & Saier Jr, M. H. (1993). In vitro binding of the pleiotropic transcriptional regulatory protein, FruR, to the *fru*, *pps*, *ace*, *pts* and *icd* operons of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of molecular biology*, 234(1), 28-44.
- Richard, H. T., & Foster, J. W. (2003). Acid resistance in *Escherichia coli*. *Advances in applied microbiology*, 52, 167-186.
- Roeder, W., & Somerville, R. L. (1979). Cloning the *trpR* gene. *Molecular and General Genetics MGG*, 176(3), 361-368.
- Ruiz, J. A., de Almeida, A., Godoy, M. S., Mezzina, M. P., Bidart, G. N., Méndez, B. S., ... & Nikel, P. I. (2012). *Escherichia coli* redox mutants as microbial cell factories for the synthesis of reduced biochemicals. *Computational and structural biotechnology journal*, 3(4), e201210019.
- Ruiz, J. A., Fernández, R. O., Nikel, P. I., Méndez, B. S., & Pettinari, M. J. (2006). *dye* (*arc*) mutants: insights into an unexplained phenotype and its suppression by the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* recombinants. *FEMS microbiology letters*, 258(1), 55-60.
- Russell, J. B. (1992). Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. *Journal of applied bacteriology*, 73(5), 363-370.
- Sabra, W., Groeger, C., & Zeng, A. P. (2015). Microbial cell factories for diol production. In *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I* (pp. 165-197). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Saier Jr, M. H. (1996). Cyclic AMP-independent catabolite repression in bacteria. *FEMS microbiology letters*, 138(2-3), 97-103.
- Saier Jr, M. H., & Ramseier, T. M. (1996). The catabolite repressor/activator (Cra) protein of enteric bacteria. *Journal of bacteriology*, 178(12), 3411.
- Salmon, K. A., Hung, S. P., Steffen, N. R., Krupp, R., Baldi, P., Hatfield, G. W., & Gunsalus, R. P. (2005). Global Gene Expression Profiling in *Escherichia coli* K12 effects of oxygen availability and ArcA. *Journal of Biological Chemistry*, 280(15), 15084-15096.
- Sardari, R. R., Dishisha, T., Pyo, S. H., & Hatti-Kaul, R. (2013). Biotransformation of glycerol to 3-hydroxypropionaldehyde: improved production by in situ complexation with bisulfite in a fed-batch mode and separation on anion exchanger. *Journal of biotechnology*, 168(4), 534-542.
- Sarkar, D., Siddiquee, K. A. Z., Araúzo-Bravo, M. J., Oba, T., & Shimizu, K. (2008). Effect of *cra* gene knockout together with *edd* and *iclR* genes knockout on the metabolism in *Escherichia coli*. *Archives of microbiology*, 190(5), 559.
- Saxena, R. K., Anand, P., Saran, S., & Isar, J. (2009). Microbial production of 1, 3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology advances*, 27(6), 895-913.

- Schaechter, M. (2001). *Escherichia coli* and Salmonella 2000: the View from Here. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(1), 119-130.
- Scheel, R. A., Ji, L., Lundgren, B. R., & Nomura, C. T. (2016). Enhancing poly (3-hydroxyalkanoate) production in *Escherichia coli* by the removal of the regulatory gene *arcA*. *AMB Express*, 6(1), 120.
- Schweder, T., & Hecker, M. (2004). Monitoring of stress responses. In *Physiological Stress Responses in Bioprocesses* (pp. 47-71). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shen, J., & Gunsalus, R. P. (1997). Role of multiple ArcA recognition sites in anaerobic regulation of succinate dehydrogenase (*sdhCDAB*) gene expression in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 26(2), 223-236.
- Shimada, T., Yamamoto, K., & Ishihama, A. (2011). Novel members of the Cra regulon involved in carbon metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 193(3), 649-659.
- Shimizu, K. (2013). Metabolic regulation of a bacterial cell system with emphasis on *Escherichia coli* metabolism. *ISRN biochemistry*, 2013.
- Shimizu, K. (2015). Metabolic regulation and coordination of the metabolism in bacteria in response to a variety of growth conditions. In *Bioreactor Engineering Research and Industrial Applications I* (pp. 1-54). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Silva-Rocha, R., Martínez-García, E., Calles, B., Chavarría, M., Arce-Rodríguez, A., de las Heras, A., & Platero, R. (2012). The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic acids research*, 41(D1), D666-D675.
- Singh, D., Fairlamb, M. S., Harrison, K. S., Weeramange, C., Meinhardt, S., Tungtur, S., ... & Swint-Kruse, L. (2017). Protein-protein interactions with fructose-1-kinase alter function of the central *Escherichia coli* transcription regulator, Cra. *bioRxiv*, 201277.
- Skarstad, K., Thöny, B., Hwang, D. S., & Kornberg, A. (1993). A novel binding protein of the origin of the *Escherichia coli* chromosome. *Journal of Biological Chemistry*, 268(8), 5365-5370.
- Smith, M. W., & Neidhardt, F. C. (1983) a. 2-Oxoacid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli*: cellular amounts and patterns of synthesis. *Journal of bacteriology*, 156(1), 81-88.
- Smith, M. W., & Neidhardt, F. C. (1983) b. Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 154(1), 336-343.
- Snyder, L., Peters, J. E. Henkin, T. M., y Champness, W. (2013). *Molecular genetics of bacteria*, 4th ed. Washington D. C: ASM Press.
- Son, Y. J., Phue, J. N., Trinh, L. B., Lee, S., & Shiloach, J. (2011). The role of Cra in regulating acetate excretion and osmotic tolerance in *E. coli* K-12 and *E. coli* B at high density growth. *Microbial cell factories*, 10(1), 52.
- Stadtman, E. R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257(5074), 1220-1224.
- Stincone, A., Daudi, N., Rahman, A. S., Antczak, P., Henderson, I., Cole, J., ... & Falciani, F. (2011). A systems biology approach sheds new light on *Escherichia coli* acid resistance. *Nucleic acids research*, 39(17), 7512-7528
- Stock, J. B., Stock, A. M., & Mottonen, J. M. (1990). Signal transduction in bacteria. *Nature*, 344(6265), 395.

- Storz, G., & Hengge, R. (Eds.). (2010). *Bacterial stress responses*. American Society for Microbiology Press.
- Stroud, R. M., Miercke, L. J., O'Connell, J., Khademi, S., Lee, J. K., Remis, J., ... & Akhavan, D. (2003). Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Current opinion in structural biology*, 13(4), 424-431.
- Sun, Y. Q., Shen, J. T., Yan, L., Zhou, J. J., Jiang, L. L., Chen, Y., ... & Xiu, Z. L. (2018). Advances in bioconversion of glycerol to 1, 3-propanediol: prospects and challenges. *Process Biochemistry*.
- Tanaka, T., Horii, T., Shibayama, K., Sato, K., Ohsuka, S., Arakawa, Y., ... & Ohta, M. (1997). RobA-induced multiple antibiotic resistance largely depends on the activation of the AcrAB efflux. *Microbiology and immunology*, 41(9), 697-702.
- Tirosh, I., & Barkai, N. (2011). Inferring regulatory mechanisms from patterns of evolutionary divergence. *Molecular systems biology*, 7(1), 530.
- Tomas, C. A., Welker, N. E., & Papoutsakis, E. T. (2003). Overexpression of *groESL* in *Clostridium acetobutylicum* results in increased solvent production and tolerance, prolonged metabolism, and changes in the cell's transcriptional program. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(8).
- United Nations Office on Drugs, Crime. Laboratory, & Scientific Section. (2009). *Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment Used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens: A Commitment to Quality and Continuous Improvement*. United Nations Publications.
- Walderhaug, M. O., Polarek, J. W., Voelkner, P., Daniel, J. M., Hesse, J. E., Altendorf, K., & Epstein, W. (1992). KdpD and KdpE, proteins that control expression of the *kdpABC* operon, are members of the two-component sensor-effector class of regulators. *Journal of bacteriology*, 174(7), 2152-2159.
- Walker, J. C. (1980). Atmospheric constraints on the evolution of metabolism. In *Limits of Life* (pp. 121-132). Springer, Dordrecht.
- Wang, D., Li, Q., Li, W., Xing, J., & Su, Z. (2009). Improvement of succinate production by overexpression of a cyanobacterial carbonic anhydrase in *Escherichia coli*. *Enzyme and Microbial Technology*, 45(6-7), 491-497.
- Wang, F., Qu, H., Zhang, D., Tian, P., & Tan, T. (2007). Production of 1, 3-propanediol from glycerol by recombinant *E. coli* using incompatible plasmids system. *Molecular biotechnology*, 37(2), 112-119.
- Wanner, B. L., Jiang, W., Kim, S. K., Yamagata, S., Haldimann, A., & Daniels, L. L. (1996). Are the multiple signal transduction pathways of the Pho regulon due to cross talk or cross regulation? In *Regulation of gene expression in Escherichia coli* (pp. 297-315). Springer, Boston, MA.
- Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V. F., & Hengge, R. (2005). Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ^S -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of bacteriology*, 187(5), 1591-1603.
- White, D. G., Goldman, J. D., Demple, B., & Levy, S. B. (1997). Role of the *acrAB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 179(19), 6122-6126.
- Wilke, D. (1999). Chemicals from biotechnology: molecular plant genetics will challenge the chemical and the fermentation industry. *Applied microbiology and biotechnology*, 52(2), 135-145.

- Wilkens, E., Ringel, A. K., Hortig, D., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). High-level production of 1, 3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(3), 1057-1063.
- Wischral, D., Zhang, J., Cheng, C., Lin, M., De Souza, L. M. G., Pessoa, F. L. P., ... & Yang, S. T. (2016). Production of 1, 3-propanediol by *Clostridium beijerinckii* DSM 791 from crude glycerol and corn steep liquor: Process optimization and metabolic engineering. *Bioresource technology*, 212, 100-110.
- Wong, G. T., Bonocora, R. P., Schep, A. N., Beeler, S. M., Fong, A. J. L., Shull, L. M., ... & Bush, E. C. (2017). The genome-wide transcriptional response to varying RpoS levels in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, JB-00755.
- Wu, X., Altman, R., Eiteman, M. A., & Altman, E. (2013). Effect of overexpressing *nhaA* and *nhaR* on sodium tolerance and lactate production in *Escherichia coli*. *Journal of biological engineering*, 7(1), 3
- Xin, B., Wang, Y., Tao, F., Li, L., Ma, C., & Xu, P. (2016). Co-utilization of glycerol and lignocellulosic hydrolysates enhances anaerobic 1, 3-propanediol production by *Clostridium diolis*. *Scientific reports*, 6, 19044.
- Xiu, Z. L., Chen, X., Sun, Y. Q., & Zhang, D. J. (2007). Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol–glucose co-fermentation in *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 33(1), 42-52.
- Yang, M., Yun, J., Zhang, H., Magocha, T. A., Zayed, H., Xue, Y., ... & Qi, X. (2018). Genetically Engineered Strains: Application and Advances for 1, 3-Propanediol Production from Glycerol. *Food technology and biotechnology*, 56(1), 3.
- Yao, R., Kurata, H., & Shimizu, K. (2013). Effect of *cra* gene mutation on the metabolism of *Escherichia coli* for a mixture of multiple carbon sources. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4(03), 477.
- Yao, R., Xiong, D., Hu, H., Wakayama, M., Yu, W., Zhang, X., & Shimizu, K. (2016). Elucidation of the co-metabolism of glycerol and glucose in *Escherichia coli* by genetic engineering, transcription profiling, and 13 C metabolic flux analysis. *Biotechnology for biofuels*, 9(1), 175.
- Yu, J. H., Zhu, L. W., Xia, S. T., Li, H. M., Tang, Y. L., Liang, X. H., ... & Tang, Y. J. (2016). Combinatorial optimization of CO₂ transport and fixation to improve succinate production by promoter engineering. *Biotechnology and bioengineering*, 113(7), 1531-1541.
- Zhang, X., Jantama, K., Moore, J. C., Jarboe, L. R., Shanmugam, K. T., & Ingram, L. O. (2009). Metabolic evolution of energy-conserving pathways for succinate production in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pnas-0905396106.
- Zhang, Y., Huang, Z., Du, C., Li, Y., & Cao, Z. A. (2009). Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol. *Metabolic Engineering*, 11(2), 101-106.
- Zhang, Y., Li, Y., Du, C., Liu, M., & Cao, Z. A. (2006). Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1, 3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Metabolic Engineering*, 8(6), 578-586.
- Zhang, Z., Aboulwafa, M., & Saier, M. H. (2014). Regulation of *crp* gene expression by the catabolite repressor/activator, Cra, in *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 24(3), 135-141.

- Zhao, X. Q., & Bai, F. W. (2009). Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *Journal of biotechnology*, 144(1), 23-30.
 - Zhao, Y. N., Chen, G., & Yao, S. J. (2006). Microbial production of 1, 3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Biochemical Engineering Journal*, 32(2), 93-99.
 - Zhu, J. G., Li, S., Ji, X. J., Huang, H., & Hu, N. (2009). Enhanced 1, 3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carrying the gene *yqhD* encoding 1, 3-propanediol oxidoreductase isoenzyme. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(7), 1217.
 - Zhu, L. W., & Tang, Y. J. (2017). Current advances of succinate biosynthesis in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology advances*, 35(8), 1040-1048.
 - Zhu, L. W., Xia, S. T., Wei, L. N., Li, H. M., Yuan, Z. P., & Tang, Y. J. (2016). Enhancing succinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* by engineering its global transcription factor, catabolite repressor/activator (Cra). *Scientific reports*, 6, 36526.
 - Zhu, X., Tan, Z., Xu, H., Chen, J., Tang, J., & Zhang, X. (2014). Metabolic evolution of two reducing equivalent-conserving pathways for high-yield succinate production in *Escherichia coli*. *Metabolic engineering*, 24, 87-96.
 - Zingaro, K. A., & Papoutsakis, E. T. (2013). GroESL overexpression imparts *Escherichia coli* tolerance to i-, n-, and 2-butanol, 1, 2, 4-butanetriol and ethanol with complex and unpredictable patterns. *Metabolic engineering*, 15, 196-205.
- Chemistry*.